

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



**DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES
(CORTICOIDES Y ANABOLIZANTES)
EN PIENSOS Y AGUAS DE CONSUMO ANIMAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Roberto Muñoz Valencia

Bajo la dirección de los doctores
Roberto Izquierdo y Raquel Gonzalo

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-1090-1**

©Roberto Muñoz Valencia, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



**Desarrollo de métodos cromatográficos para la
determinación de esteroides (corticoides y anabolizantes)
en piensos y aguas de consumo animal**

MEMORIA

Que para optar al grado de Doctor

presenta:

Roberto Muñoz Valencia

MADRID, 2008

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a:

Roberto Izquierdo y Raquel Gonzalo por haberme aceptado para realizar la tesis doctoral bajo su tutela, por su entera dedicación y ayuda durante este periodo. A Ana Santos por intervenir en la discusión de los resultados. Pero sobre todo, por su calurosa amistad.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Gobierno de México por la beca concedida.

Silvia por todo su amor y apoyo.

Mi familia, especialmente a mis padres, Jesús y Patricia, por apoyarme en todas mis decisiones y ayudarme a la consecución de todas ellas. A mi hermana y Cuñado por su compañía. A mi primor “Tin” por sus visitas relámpago.

Carmen y Manolo por su cariño y apoyo.

Mis amigos de Sevilla, en especial a José Marcos Jurado y Ángela Alcázar.

Al Departamento de Química Analítica de la UCM.

A:

MI ESPOSA E HIJO (A)

MIS PADRES

ÍNDICE

Pág.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	<i>i</i>
OBJETIVO DEL TRABAJO	<i>iii</i>
CAPÍTULO I Introducción	<i>1</i>
I.1. HORMONAS.....	<i>3</i>
I.1.1. Definición y clasificación de hormonas esteroideas	
I.1.2. Regulación de la secreción hormonal.....	<i>5</i>
I.2. ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÉNICOS.....	<i>5</i>
I.2.1. Historia	
I.2.2. Biosíntesis y metabolismo.....	<i>6</i>
I.2.3. Anabolizantes sintéticos.....	<i>8</i>
I.2.4. Fisiología.....	
I.2.5. Aplicaciones.....	<i>10</i>
I.2.5.1. Clínicas	
I.2.5.2. En el deporte.....	<i>11</i>
I.2.5.3. Como promotores de producción de carnes.....	<i>12</i>
I.2.6. Efectos.....	<i>14</i>
I.3. CORTICOIDES.....	<i>15</i>
I.3.1. Historia	
I.3.2. Biosíntesis y metabolismo	
I.3.3. Corticoides sintéticos.....	<i>17</i>
I.3.4. Fisiología.....	<i>18</i>
I.3.5. Aplicaciones.....	<i>19</i>
I.3.5.1. Clínicas	
I.3.5.2. En el deporte	
I.3.5.3. Como promotores de producción de carnes.....	<i>20</i>
I.3.6. Efectos	
I.4. ASPECTOS INHERENTES AL ANÁLISIS DE ESTEROIDES EN PIENSOS.....	<i>21</i>
I.4.1. Componentes	
I.4.2. Utilidad del análisis.....	<i>23</i>
I.5. OPTIMIZACIÓN SISTEMÁTICA DE SEPARACIONES POR HPLC.....	<i>23</i>
I.5.1. En isocrático.....	<i>24</i>
I.5.1.1. Ajuste de la selectividad	

a) Influencia de la fuerza del disolvente	
b) Influencia del tipo de disolvente	
c) Empleo de mezclas de disolventes orgánicos.....	25
d) Efecto de la fase estacionaria.....	26
e) Efecto de la temperatura.....	30
f) Efecto del pH.....	31
1.5.2. En gradiente.....	31
1.5.2.1. Principios de la separación.....	32
1.5.2.2. Optimización de la separación.....	33
a) Influencia de la pendiente	
b) Influencia del rango	
c) Influencia de la forma	
1.5.2.2.1. Ajuste de la selectividad.....	34
a) Pendiente	
b) Tipo de disolvente	
c) Otras variables	
I.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	34
I.6.1. Toma y conservación de muestra	
I.6.2. Preparación de muestra	
a) Lixiviación.....	35
b) Extracción líquido-líquido	
c) Extracción en fase sólida.....	36
d) Hidrólisis	38
e) Saponificación	
f) Derivatización.....	39
g) Preconcentración.....	40
I.7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
I.7.1. Necesidad y entorno legal.....	41
CAPÍTULO II Antecedentes bibliográficos.....	43
II.1. En cromatografía de líquidos.....	45
II.2. En cromatografía de gases.....	52
II.3. Artículos sobre revisiones.....	58
II.4. Comentarios sobre la revisión bibliográfica.....	59

CAPÍTULO III Desarrollo y validación de métodos para esteroides en piensos y aguas de consumo animal.....	61
III.1. Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de esteroides (corticoides y anabolizantes) en pienso.....	63
III.1.1. Introducción.....	65
Publicación: “LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD DEVELOPMENT FOR STEROIDS DETERMINATION (CORTICOIDS AND ANABOLICS). APPLICATION TO ANIMAL FEED SAMPLES”...	67
III.2. Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso usando una columna monolítica.....	77
III.2.1. Introducción.....	79
Publicación: “LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD DEVELOPMENT FOR ANABOLIC STEROIDS USING A MONOLITHIC COLUMN. APPLICATION TO ANIMAL FEED SAMPLES”	81
III.3. Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de corticoides en pienso usando una columna monolítica.....	99
III.3.1. Introducción.....	101
Publicación: “METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR CORTICOIDS IN ANIMAL FEED SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY USING A MONOLITHIC COLUMN”	103
III.4. Mejoras en el tratamiento de muestra para el análisis de esteroides en piensos.....	111
III.4.1. Introducción.....	113
Publicación: “SAMPLE PREPARATION PROCEDURE IMPROVEMENT FOR STEROIDS (CORTICOIDS AND ANABOLICS) DETERMINATION IN ANIMAL FEED SAMPLES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY”	115
III.5. Desarrollo y validación de un método por HPLC con elución en gradiente para la determinación de esteroides (corticoides y anabolizantes) en aguas de consumo animal.....	131
III.5.1. Introducción.....	133
Publicación: “SEPARATION OF A COMPLEX MIXTURE OF STEROIDS (CORTICOIDS AND ANABOLICS) BY REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY GRADIENT ELUTION. APPLICATION TO ANIMAL FEEDING WATER”	135
III.6. Desarrollo y validación de un método por GC-MS para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso.....	145
III.6.1. Introducción.....	147
Publicación: “GC-MS METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR ANABOLIC STEROIDS IN FEED SAMPLES”	149

CAPÍTULO IV Conclusiones.....	165
CAPÍTULO V Discusión integradora.....	175
V. 1. Logros alcanzados.....	177
V. 2. Futuras investigaciones	
CAPÍTULO VI Bibliografía.....	179
ANEXO I.....	197
Guía de validación de métodos analíticos según la directiva 2002/657/EC de la Unión Europea	

Glosario de abreviaturas

Analitos

ACTH = Adrenocorticotropina
 AND = Androsterona
 ANDOA = Androstendiona
 Andr = Andrógenos
 CB = Clostebol
 CBG = Transcortina
 CC = Corticoides
 CL = Cortisol
 CLE = Clembuterol
 CLO = Clortestosterona
 CT = Corticosterona
 DES = Dietilestilbestrol
 DZ = Danazol
 EAA = Esteroides anabolizantes androgénicos
 EEST = Etinilestradiol
 ES = Estanozolol
 EST = Estradiol
 Ester = Esteroides
 Estro = Estrógenos
 ETIO = Etiocolanolona
 E-X = Epímero de X
 Ge = Gestágenos
 GLU = Glucorónidos
 LH = Hormona luteinizante
 MeB = Metilboldenona
 met = Metabolitos
 NET = Noretandrolona
 NG = Norgestrel
 NOA = Norandrostendiona
 NT = Noretindrona
 PG = Progesterona
 PREG = Pregnenolona
 Prop = propionato
 TB = Trembolona
 Val = Valerato
 Z = Zeranol

Agentes derivatizantes

BSA = N,O-bis-(trimetilsilil) acetamida
 DTE = Ditioeritritol
 HFBA = Anhídrido heptafluorobutírico
 IM = Imidazol
 MTSFA = N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida
 PFPA = Anhídrido pentafluoropropílico
 Py = Piridina
 TBDMS = Tercbutildimetilsilano
 TFAA = Anhídrido trifluoroacético
 TMCS = Trimetilclorosilano
 TMIS = Trimetilyodosilano
 TMS = Trimetilsilano
 TMSI = Trimetilsililimidazol

Disolventes

AcEt = Acetato de etilo
 ACT = Acetona
 BuOH = Butanol
 DCM = Diclorometano
 DEE = Dietil-éter
 EtOH = Etanol
 Hex = Hexano
 MeOH = Metanol
 Pen = Pentano
 PeOH = Pentanol
 ProH = Propanol
 TBME = Terbutilmetileter
 TCE = Tricloroetano

Tipo de muestra

A = Agua
 Al = Alimento
 B = Bilis
 C = Carne
 Ce = Cerebro
 Cre = Crema
 G = Grasa
 Got = Gotas
 H = Hígado
 Hec = Heces
 In = Inyecciones
 IS = Estándar interno
 Jar = Jarabe
 Le = Leche
 Me = Medicamento
 O = Orina
 P = Plasma
 Pa = Patrones
 Pe = Pelo
 Pi = Piel
 Pie = Pienso
 Pil = Píldoras
 S = Suero
 Sa = Saliva
 Su = Suspensión
 T = Tejido
 Ta = Tabletas

Otras especies químicas

A = Acetónido
 Ac = Acetato
 Fr = Formiato

Otras

Ac. = Ácido
 AR = Artritis reumatoide
 BOE = Boletín oficial del estado
 CC α = Límite de decisión
 CC β = Capacidad de detección
 CTAB = Bromuro de cetil-trimetil amonio
 CV = Coeficiente de variación
 d.i. = Diámetro interno
 DAD = Detector de diodos en serie
 E = Extracción
 Ec. = Ecuación
 EFS = Extracción en fase sólida
 EI = Impacto electrónico
 ELL = Extracción líquido-líquido
 EQ = Electroquímica/o
 FA = Fase acuosa
 FID = Ionización en llama
 Fig. = Figura
 Flu = Fluorescencia
 FM = Fase móvil
 FO = Fase orgánica
 Frac = Fraccionamiento
 GC = Cromatografía de gases
 GRAD = Gradiente
 Hidro = Hidrólisis
 HPLC = "High performance liquid chromatography"
 IA = Inmunofinidad
 IAC = Cromatografía de inmunofinidad
 IR = Infrarrojo
 LC = Límite de cuantificación
 LD = Límite de detección
 LDL = Lípidos de baja densidad
 MIP = Polímeros de impresión molecular
 MS = Espectrometría de masas
 PI = Patrón interno
 Pur = Purificación
 Q = Quimioluminiscencia
 Ref. = Referencia
 RIA = Ensayo de radioinmunofinidad
 RMN = Resonancia magnética nuclear
 RMNm = Ácido ribonucleico mensajero
 SDS = Dodecilsulfato sódico
 Si = Sílice o Sílica
 SIDA = Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
 TLC = Cromatografía de capa fina
 TOF = Tiempo de vuelo
 UE = Unión Europea
 UV = Ultravioleta

OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo principal de esta memoria es el desarrollo de procedimientos cromatográficos, mediante HPLC y GC-MS para el análisis de mezclas complejas de esteroides (corticoides y anabolizantes). Debido a la dificultad intrínseca en la separación de estos compuestos (gran similitud estructural) y dentro de este contexto, se estudian aquellas variables que pueden afectar a la separación cromatográfica.

Con posterioridad, se aplicarán las separaciones obtenidas a la determinación de estos compuestos en muestras de pienso y aguas de consumo animal para controlar su administración ilegal y así prevenir consecuencias negativas en el bienestar del animal y salud del consumidor. El análisis de esteroides no es una tarea fácil debido al gran número que pueden ser añadidos al pienso o agua, a su similitud estructural y a la complejidad de la matriz. Por estas razones, se evaluarán los procesos de preparación de muestra necesarios en los análisis.

CAPÍTULO I

Introducción

I.1. HORMONAS

Son sustancias químicas que, secretadas por una célula (o un grupo de ellas) de un tejido específico, y transportadas por los fluidos fisiológicos, regulan (estimulan o inhiben) funciones metabólicas del organismo tales como el control de la intensidad de funciones químicas en las células, el transporte de sustancias a través de las membranas así como su crecimiento y secreción (1-4).

Desde el punto de vista químico se clasifican en tres grupos: esteroides, derivados de tiroxina y proteínas o péptidos (Fig. 1).

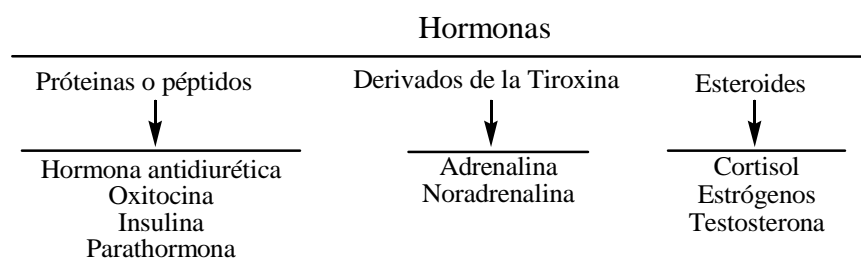


Fig. 1. Clasificación general de las hormonas.

I.1.1. Definición y clasificación de hormonas esteroideas

Con la denominación general “esteroide” (del griego “stereos”: duro, sólido) se incluyen a todos los compuestos con un esqueleto del tipo de los esteroides, de los cuales el colesterol (Fig. 2) es el más conocido. Su presencia (en aceites vegetales, células animales y particularmente abundante en el tejido nervioso e hígado) y la de sus metabolitos es fundamental para el desarrollo de todas las formas de vida.

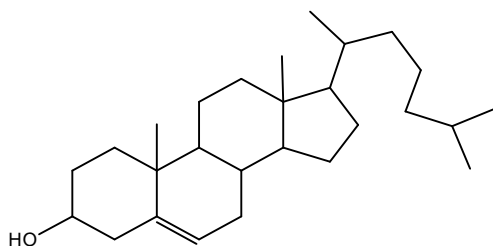


Fig. 2. Estructura del colesterol.

La estructura básica de todos los esteroides, incluidos los corticoides (CC) y anabolizantes androgénicos (EAA), deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno completamente reducido (Fig. 3). Una característica de los esteroides es la presencia de sustituyentes oxigenados en las posiciones 3 y 17, así como uno o dos grupos metilos angulares (numerados en el núcleo como 18 y 19) en las posiciones 10 y 13. Debido a la complejidad estructural de los esteroides, se pueden producir alteraciones importantes de la actividad fisiológica y en la geometría de las uniones entre anillos, dando lugar normalmente a compuestos inactivos debido a cambios estructurales mínimos (e.g. grupos funcionales en distintas posiciones). Estas modificaciones se logran insertando grupos funcionales para generar hormonas más hidrosolubles o activas cuando se administran por vía oral o bien para modificar su absorción. La mayoría de los esteroides se enlazan con proteínas plasmáticas específicas, lo que les permite permanecer en la sangre durante periodos

más prolongados que su forma libre. Se considera que la forma activa es únicamente la hormona libre y sólo ésta es capaz de unirse a su receptor (1,2).

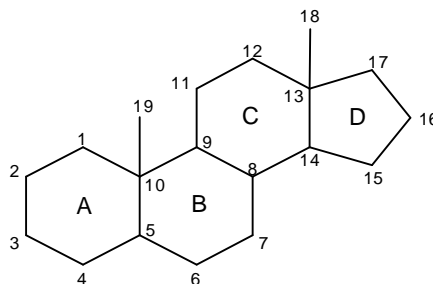


Fig. 3. Núcleo esteroideo básico.

Las hormonas esteroideas tienen estructura básica similar y se clasifican en (Fig. 4):

a) **Adrenales**, sintetizadas en la corteza de las glándulas suprarrenales. Contienen 21 átomos de carbono y se dividen en tres grupos: *corticoides* (e.g. cortisol, cortisona, corticosterona), *mineralocorticoides* (e.g. aldosterona, deoxicorticosterona) y *andrógenos adrenales* (e.g. androsterona, testosterona, etc.).

b) **Sexuales**, favorecen el crecimiento y formación de las características sexuales primarias y secundarias. Se dividen en dos grupos: sexuales masculinas (*andrógenos*), conteniendo 19 átomos de carbono (e.g. testosterona, dehidroepiandrosterona, etc.) y sexuales femeninas (*estrógenos*), conteniendo 18 átomos de carbono (e.g. estradiol, estriol, etc.).

c) **Otras** (e.g. vitamina D₃, tiroxina).

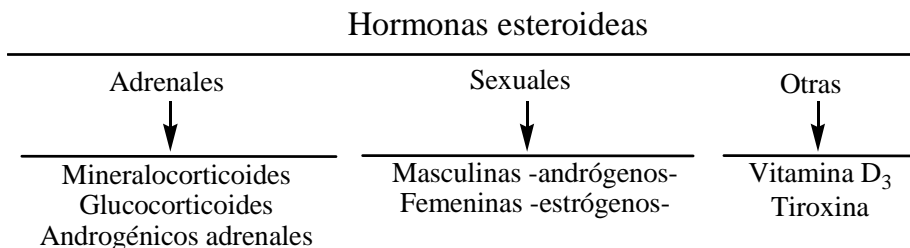


Fig. 4. Clasificación de las hormonas esteroideas.

Un grupo de estas hormonas lo constituyen los EAA. El más común, testosterona (T), es la hormona masculina gonadotrópica sintetizada principalmente en las células de Leydig de los testículos (95%) y en la corteza adrenal, aunque también se produce una pequeña cantidad en los ovarios de la mujer. Es la responsable de los efectos androgénicos (masculinizantes) y anabolizantes (formadores de tejidos). Por esta razón, la T, derivados sintéticos y metabólicos se denominan de manera más específica EAA, basándose en la consideración de que esteroides anabolizantes poseen propiedades androgénicas, mientras que los andrógenos ejercen acciones anabolizantes. Por lo tanto, los efectos hormonales androgénicos no pueden disociarse de los anabolizantes porque en ambos el intermediario es un único receptor (3).

I.1.2. Regulación de la secreción hormonal

Muchas hormonas son secretadas mediante un mecanismo de cascada. Con frecuencia la regulación de este patrón de secreción se lleva a cabo mediante un proceso denominado retroalimentación negativa (“feedback”). Mediante este proceso, la concentración de la hormona indica la necesidad de aumentar o disminuir su producción. Todas las hormonas se hallan bajo un control de este tipo, siendo la misma hormona (B) o algún otro tipo de función o de sustrato (A) la señal que inicia el mecanismo (e.g. glucemia para la insulina, etc.). En circunstancias poco frecuentes, la secreción hormonal se regula mediante retroalimentación positiva (“feedforward”). En este caso, la hormona final que se produce aumenta o induce a la hormona inicial e incrementa su propia producción **(1)**.

I.2. ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÉNICOS

I.2.1. Historia

Debido a que los testículos son críticos para revelar el genotipo masculino, en 1771, Hunter transplantó los testículos del gallo a la gallina y observó en ésta caracteres masculinos. En 1849, Berthold demostró que los testículos transplantados en gallos castrados devuelven a éstos los caracteres propios de su sexo.

En 1889, Brown-Séquard, neurólogo inglés, confirmó su teoría de que las sustancias químicas de los testículos incrementaban el vigor físico, inyectándose extracto testicular y proporcionando muestras de este *líquido testicular* a algunos médicos dispuestos a probarlo. La oferta generó una ola de experimentos internacionales encaminados a curar enfermedades tales como tuberculosis, cáncer, diabetes, parálisis, gangrena, anemia, arteriosclerosis, gripe, histeria, migraña. La nueva ciencia de los extractos animales hundía sus raíces en el tratamiento de un órgano con otro idéntico. Este acontecimiento marcaría la pauta para una actuación más reciente llevada a cabo por Ziegler, uno de los descubridores de los EAA **(5)**. En 1912 cuando dos médicos de Filadelfia transplantaron un testículo humano se inició el transplante de material sexual humano y animal a pacientes afectados de lesión o disfunción de glándulas sexuales **(3)**.

Antes de que Stanley y col. (médicos de San Quintín) iniciaran los trasplantes de testículos, otros habían empezado a buscar una sustancia dotada de propiedades androgénicas. En 1911, Pézard descubrió que la cresta de un capón macho crecía en proporción directa a la cantidad de extractos testiculares que les inyectaba al nacer. Durante los siguientes años los investigadores utilizaron pruebas similares para determinar los efectos androgénicos de diversas sustancias aisladas de testículos animales y orina humana. En 1931, Butenandt aisló la androsterona (hormona masculina no testicular) a partir de orina humana. En los siguientes años, varios trabajos confirmaron que los testículos contenían un factor androgénico más potente, la testosterona, lo que condujo posteriormente a la síntesis de distintos EAA **(3)**.

El equipo de Laqueur presentó el trabajo "Sobre la hormona masculina cristalina procedente de los testículos (la testosterona)", un clásico en la historia del género. En ese mismo año, Butenandt y Hanisch publicaron un artículo en el que describían un método para preparar la testosterona a partir del colesterol. Más tarde, Ruzicka y Wettstein publicaron el trabajo "Sobre la preparación artificial de la hormona testicular

testosterona (androsteno-3-ona-17-ol)". Butenandt y Ruzicka acabaron compartiendo el Premio Nobel de Química en 1939 por este descubrimiento.

En los años 30s, se utilizaron los EAA naturales con propósitos terapéuticos para promover un balance de nitrógeno positivo en víctimas de inanición y varones con hipogonadismo. También se recetó testosterona ante diversos trastornos de la mujer (e.g. menorragia, dolores mamarios, dismenorrea). A raíz de la terapia femenina con testosterona se comprobó que los andrógenos despertaban o intensificaban la libido en la mayoría de los pacientes. La idea de que la testosterona contrarrestaba los efectos de los estrógenos estimuló su uso en homosexuales con resultados no satisfactorios (6). En 1935, Kochakian publicó que los andrógenos estimulaban el anabolismo de las proteínas, sugiriendo que la terapia fundada en ellos restaurase el tejido protéico y promoviese el desarrollo del tejido muscular en pacientes de determinado espectro de alteraciones. La bibliografía clínica de principios de los años 40s se ocupó con frecuencia de la correlación entre andrógenos y desarrollo muscular, jugando incluso con la posibilidad de que tales compuestos incrementasen el rendimiento deportivo. A partir de estos años, incontables deportistas de élite y fisicoculturistas ("body building") han tomado estos fármacos para desarrollar su masa muscular e intensificar los regímenes de entrenamiento. En la actualidad también se utilizan como agentes promotores de crecimiento en la producción de carne.

I.2.2. Biosíntesis y metabolismo

Los principales tejidos implicados en la síntesis de EAA son la corteza suprarrenal, los testículos y los ovarios siendo las células de Leydig o células intersticiales de los testículos las que producen la mayoría de los EAA (1-4). Los EAA se pueden sintetizar a partir de colesterol. El colesterol se obtiene principalmente del LDL-colesterol circulante en el plasma, penetrando en el interior de las células corticales por la influencia de la ACTH y allí, mediante la intervención de diferentes enzimas, comienza la síntesis de todos los esteroides. El paso inicial en la síntesis de esteroides es la conversión de colesterol a pregnenolona a través de la hidroxilación en las posiciones 20 y 22 y anclaje de la cadena lateral (Fig. 5). Este paso ocurre en las mitocondrias y es un factor limitante en la síntesis de esteroides.

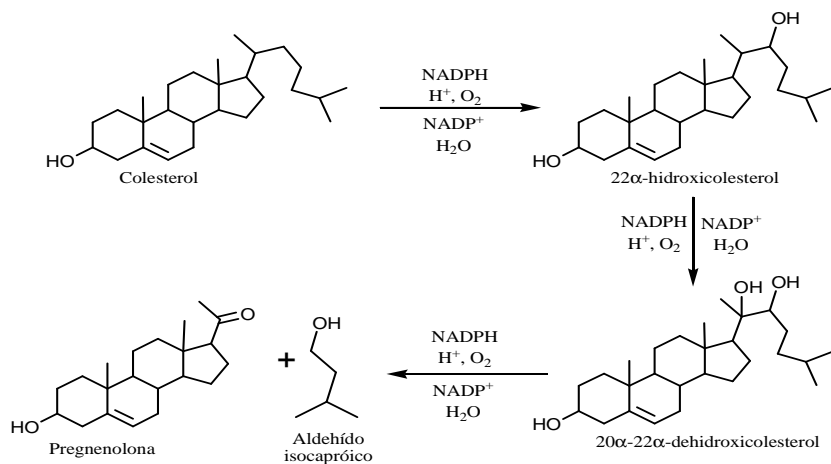


Fig. 5. Conversión del colesterol a pregnenolona (1-3).

Una vez formada la pregnenolona, la síntesis de EAA puede seguir varias rutas metabólicas (**Fig. 6**). Cada paso de la cadena es catalizado por una enzima que va transformando cada EAA en el siguiente, hasta llegar al esteroide final de la cadena. Una vez sintetizados, son transportados por la sangre, unidos a proteínas plasmáticas de unión específica y albúminas. En condiciones normales cerca del 94% se transporta de forma fija y el 6% de forma libre. Ésta última es la que produce la respuesta biológica ya que es capaz de penetrar en las células blanco o diana.

La degradación o catabolismo de las hormonas esteroideas que no entran en las células diana, tiene lugar en el hígado principalmente por reducción, oxidación y/o conjugación con glucuronato o sulfato. Cerca del 25% se excretan en la bilis y el 75% restante en la orina. Las formas conjugadas de estas hormonas son inactivas (**6,7**).

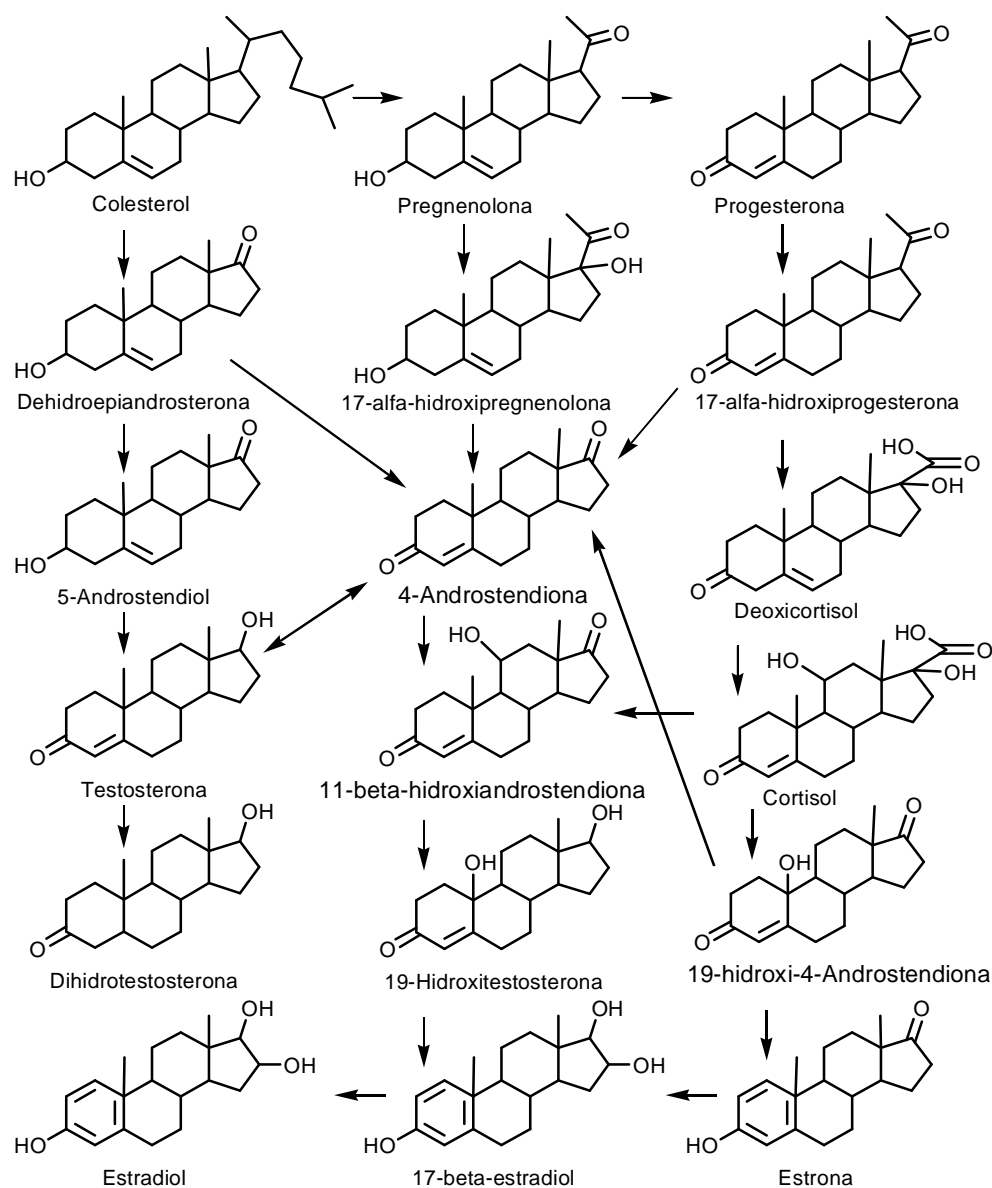


Fig. 6. Biosíntesis de esteroides andrógenos y estrógenos.

I.2.3. Anabolizantes sintéticos

A partir de los años 30s, la síntesis de esteroides ha sido muy rápida, especialmente en lo que se refiere a la síntesis de nuevos fármacos derivados de los andrógenos, en los que se ha conseguido aumentar la actividad anabólica frente a la androgénica, aunque sin lograr la total desaparición de esta última. Este objetivo se consigue químicamente mediante:

- La introducción de un sustituyente en posición 1 ó 4 (e.g., clostebol).
- La introducción de un doble enlace en el anillo A del esteroide (e.g., boldenona).
- La fusión de un anillo heterocíclico (e.g., estanozolol).
- La pérdida del grupo metilo en la posición 19 (e.g., nandrolona).

Por otra parte, para poder modificar la adsorción, se varía la estructura mediante la introducción de un grupo alquilo en posición 17 con estereoquímica trans (e.g., metiltestosterona) (**Fig. 7**).

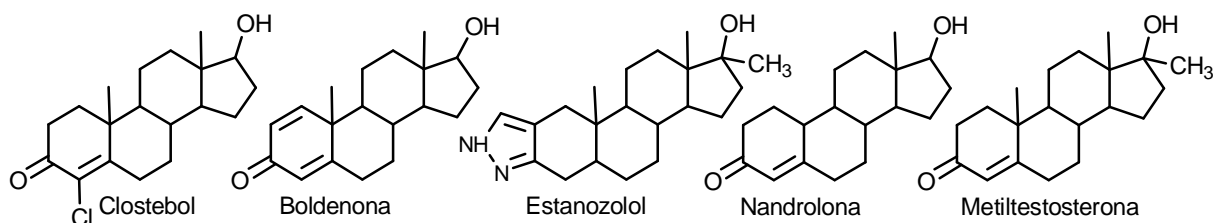


Fig. 7. Esteroides anabolizantes sintéticos.

La mayoría de los EAA sintéticos derivan de la testosterona. Los que poseen mayor actividad androgénica son la mesterolona y derivados 17α -alquilados, entre los que destacan la metiltestosterona y la fluoximesterona. Entre los derivados en los que las diversas modificaciones de la molécula han reducido su actividad androgénica e incrementado la anabolizante se encuentran la nandrolona, oximesterona, metelona, oxandrolona, estanozolol, testolactona y dromostanolona. Mención aparte merece el danazol, derivado de la etisterona, que muestra débil actividad androgénica y carece de actividad estrogénica y gestágena.

I.2.4. Fisiología

Los andrógenos más importantes producidos por el testículo son la testosterona (T), dehidrotestosterona y 4-androstenodiona (**Fig. 8**). La cantidad de T sintetizada es tan grande en relación con las otras dos, que puede considerarse como el andrógeno testicular, representando el 95% de la T presente en plasma de hombres normales. La **Tabla 1** muestra la tasa de secreción y concentraciones normales de los EAA mencionados en varones sanos.

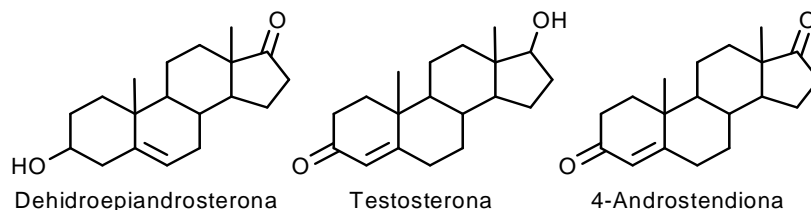


Fig. 8. Principales esteroides en el varón.

Tabla 1. Tasas de secreción y concentraciones en plasma de los principales andrógenos.

EAA	Secreción por testículos (ng/día).	Concentración vena periférica (ng/100mL).	Concentración vena espermiática (ng/100mL).
Testosterona	5000	700	10000 – 60000
4-Androstenodiona	2500	100	100 – 1200
Dehidrotestosterona	50 - 100	30	60 – 800

Debido a esta relación entre hormonas estructuralmente similares con propiedades físicas muy diferentes, los efectos de la testosterona segregada (y administrada exógenamente) están relacionados con la proporción de la testosterona endógena con respecto a sus metabolitos. En la mujer y hombre pre-pubertad, las concentraciones de T en plasma son más bajas que en adultos (**Tabla 2**). El componente biológicamente activo representa el 2% de la T libre en el plasma (**3**).

Tabla 2. Referencias de concentración plasmática de testosterona.

Sexo	Concentración en plasma (ng/dL).				
Mujeres	Antes de la pubertad	6 - 7	Hombres	Antes de la pubertad	6 - 7
	Adulto	20 - 75		Prepuberal	10 - 20
	Embarazadas	60 - 300		Adulto	300 - 1200
	Postmenopáusicas	8 - 35		Adulto castrado	45 - 50

El efecto de los andrógenos se divide en dos etapas en la vida del humano, durante el período fetal y a partir de la pubertad. Las células de Leydig fetales inician la esteroidogénesis en la 7ª semana de gestación. Durante este periodo la T es indispensable para diferenciar el sistema reproductor y nervioso central en el feto macho. En el hombre, la repentina producción de T determina el comienzo de la pubertad. Durante la pubertad, la producción de T aumenta desde cantidades inferiores a 6 a 1200 ng/dL. En la mujer, ovarios y corteza adrenal son responsables de su producción. Al menos la mitad de la T en la mujer proviene de la conversión metabólica de androstendiona en tejidos periféricos. Su producción diaria en la mujer adulta es menor a 75 ng/dL (**Tabla 2**).

Los efectos fisiológicos de la T y los EAA sintéticos son conducidos a través de un receptor de naturaleza esteroidea. La forma reducida de la T (dehidrotestosterona) es el principal mediador intracelular de su acción hormonal. La androsterona y eticolanolona (metabolitos mayoritarios en orina) son inactivos fisiológicamente. El estradiol es un metabolito activo que inhibe la actuación de las gonadotropinas, conduciendo a la feminización (**4**).

El mecanismo de acción de las hormonas esteroideas en general, y de la T en particular, es bastante conocido. En el torrente sanguíneo (después de ser segregados o después de la administración exógena), los EAA pasan a través de la pared celular del tejido correspondiente y se unen a los receptores de los esteroides localizados en el citoplasma. Este complejo hormona-receptor es trasladado al núcleo, donde se une al lugar del receptor de la cromatina resultante de la síntesis proteica. La transcripción producida, origina la producción de ARNm específico. La traducción ribosómica de los resultados codificados da como resultado nuevas proteínas altamente específicas que median la función de las hormonas (**Fig. 9**).

En el músculo esquelético, el factor limitante de la acción de los EAA es el número de sus complejos receptores. Esto implica que la dosis supra-fisiológica de estos compuestos no tiene posterior efecto sobre los cambios del músculo esquelético (2).

Los receptores anabolizantes no sólo existen en el músculo esquelético sino también en otros tejidos del cuerpo, incluyendo próstata, corazón, testículos, túbulos seminíferos y, probablemente, el cerebro. Esta abundancia de receptores en distintos tejidos la que conduce a sus efectos fisiológicos. La T y sus metabolitos activos son los responsables de la aparición de caracteres masculinos primarios en el útero y periodo neonatal.

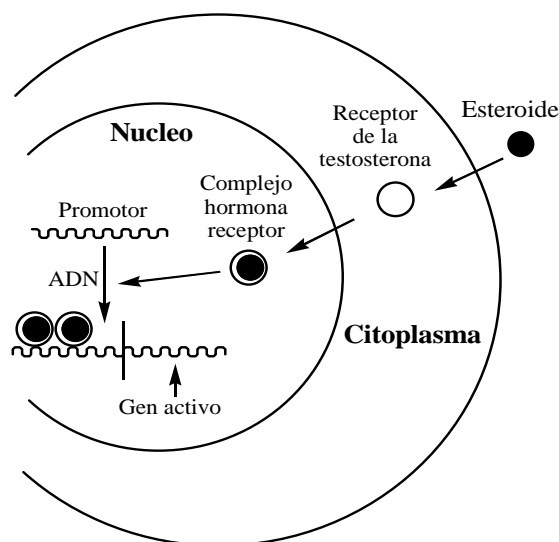


Fig. 9. Mecanismo de acción de esteroides en el órgano diana.

El comienzo de producción de T en la pubertad se hace patente con la aparición de caracteres masculinos secundarios: aumento de testículos y pene, alargamiento de la laringe (voz más grave), proliferación de la glándula sebácea (acné), crecimiento del vello púbico, facial y axilar, aumento de altura y músculo esquelético, indudablemente influenciado por la aparición de la T (pero también por otros cambios fisiológicos y hormonales).

En unas especies la agresividad y orientación sexual están influenciadas fuertemente por la T. Algunos autores han demostrado una relación entre los niveles de T plasmática y la agresividad. Estos estudios implican que los receptores del cerebro son importantes mediadores de los efectos psicológicos de los EAA.

I.2.5. Aplicaciones

I.2.5.1. Clínicas

Los usos clínicos de la T sintética se remontan a los orígenes de la androterapia. Los EAA han sido empleados para reemplazar las hipogónadas masculinas durante la adolescencia; para acelerar la iniciación del crecimiento; para estimular la producción de eritrocitos (eritropoyesis) en desórdenes hematológicos, y

como terapia paliativa en el cáncer de mama y osteoporosis avanzada. Se han administrado también para tratar la impotencia en pacientes con niveles séricos de T normales o por debajo de lo normal (3). Sus ésteres se emplean para estimular el crecimiento e iniciar la pubertad en niños con problemas de desarrollo. Desde los años 40s se ha venido recurriendo a los andrógenos para tratar las afecciones asociadas con enfermedades debilitantes crónicas, traumatismos, quemaduras, cirugía y radioterapia. Desde finales de los años 30s hasta mediados de los 80s, los psiquiatras prescribieron EAA para curar la depresión, melancolía y psicosis involutiva. Desde los años 60s se viene trabajando en ésteres de T para convertirlos en un posible método de regulación de la fertilidad masculina. Estos ésteres se usan hoy como coadyugantes en el tratamiento con hormona del crecimiento. Los EAA se han aplicado para tratar la debilidad y reducción muscular que caracteriza al SIDA. El estudio de estos casos clínicos indica que los pacientes experimentan una sensación de bienestar, aumento de masa muscular, vigor y apetito.

Es aconsejable el análisis de la concentración de T en disfunciones tales como la infertilidad, originada generalmente por lesiones en el hipotálamo o hipófisis, dando lugar a reducción en la producción de gonadotropinas (1,2); resistencia a andrógenos, debido a la mutación de un solo gen (1,5); pubertad precoz, que puede ser resultado de dos factores patológicos: afección del tejido del hipotálamo dependiente de la gonadotropina llamada pubertad precoz verdadera y secreción anormal de hormonas sexuales, llamada pubertad pseudoprecoz (1,4) e hirsutismo, causado por hiperandrogenia primaria, tumores de las glándulas suprarrenales y ovarios (1,2).

I.2.5.2. En el deporte

La primera noticia sobre el uso de anabolizantes apareció en 1954, siendo éstos empleados por atletas rusos para aumentar la fuerza y potencia. Esto condujo al descubrimiento y uso de anabolizantes en USA. Inicialmente, los levantadores de peso ingirieron la droga. Finalmente su uso se extendió rápidamente a futbolistas y nadadores. Los atletas creían que habían descubierto una droga maravillosa y vieron como desventaja no consumirla.

La incidencia exacta del empleo de los EAA por atletas profesionales o amateur no es conocida pero está considerada como extendida (3,4). Se estima que los atletas gastan 100 millones de dólares anuales en anabolizantes, el 20% a través de prescripciones legales y el resto en el mercado negro. Los profesionales de la salud y distribuidores legales de las drogas han estado implicados en la actividad ilegal y el mercado negro.

El atleta, en un esfuerzo para evitar la detección del consumo de EAA, ha combinado el consumo de EAA con periodos de descanso y drogas que diluyen la orina o bloquean su detección. Los analistas de drogas trabajan con bajos límites de detección, mayor conocimiento de sus metabolitos y los posibles agentes bloqueantes.

La detección positiva de la administración de T por medio de la relación $T/ET > 6$ en orina, diferenciando su origen exógeno o endógeno, es una de las problemáticas del control antidopaje. De hecho, la detección en sangre de las sustancias realmente administradas (ésteres de T) permitirá la confirmación irrefutable de los casos dudosos. En el futuro podrán emplearse otras muestras como saliva o pelo (8,9).

Según el BOE de 27 Diciembre de 2006 (Real Decreto 2269-8/2006), está prohibido el uso de EAA por deportistas, autorizándose su uso a dosis terapéuticas. Cuando el médico responsable del deportista considere justificada su administración deberá comunicarlo por escrito previamente **(10)**.

I.2.5.3. Como promotores de producción de carnes

Desde el comienzo de la utilización de los animales para el consumo humano, el hombre ha buscado mejorar la productividad. Las mejoras en el rendimiento de las producciones animales conseguidas en los últimos años son espectaculares. La intensificación de las producciones animales, ha contado con diversos métodos de apoyo, tales como el perfeccionamiento de las técnicas de producción habituales, la introducción de nuevas técnicas y procedimientos.

La Organización Mundial de la Salud define el término *agente promotor del crecimiento* como “aquellas sustancias, distintas de los nutrientes de la ración, que aumentan el ritmo de crecimiento y mejoran el índice de conversión de nitrógeno de animales sanos y correctamente alimentados“. Por ello, dicho término, se puede aplicar a más de un tipo de sustancias usadas en producción animal. La denominación de compuesto anabólico para el especialista en producción animal es aquella sustancia que retenga nitrógeno para que el animal aumente su masa muscular, sin importar su origen. Desde el punto de vista terapéutico es un esteroide, con gran capacidad androgénica, es decir, un esteroide androgénico anabólico **(11)**.

En los rumiantes sanos, el ritmo de crecimiento y la eficiencia de conversión del pienso pueden modificarse mediante la administración de dos tipos de sustancias estimulantes del crecimiento: las primeras incluyen a los agentes anabolizantes que actúan sobre los procesos metabólicos y las segundas a las sustancias anabólicas activas a nivel ruminal que modifican las fermentaciones **(12)**.

Los primeros ensayos con uso de EAA como promotores del crecimiento en la ceba de novillos fueron hechos por Dinusson en 1948 **(13)**. Los primeros datos sobre el empleo de compuestos con actividad β -agonista, datan de los años 80s, empleando clenbuterol como agente capaz de incrementar la masa muscular y disminuir la proporción de grasa en novillos **(14)**.

Los agentes androgénicos anabolizantes pueden administrarse por vía oral o parenteral. Se administran oralmente a cerdos como aditivos del alimento y ésta será la vía a escoger si se tiene cría de peces. Generalmente, los EAA se administran como implantes subcutáneos en bovinos, borregos y aves, o inyectados como soluciones oleosas en caballos. Los EAA utilizados en soluciones oleosas generalmente se administran por razones terapéuticas, siendo corta su acción hormonal. Es más generalizado para fines de producción animal en ganado de carne los implantes subcutáneos en la base de la oreja, y deben estar sujetos a una época de retracción o con dosis específicas **(15)**.

En teoría, la utilización de estas sustancias presenta una serie de ventajas relacionadas no sólo con la mejora de la productividad, sino también de la calidad, puesto que las carnes procedentes de animales tratados con EAA presentan un mayor tejido magro. Esta característica está cobrando cada vez mayor importancia debido a la problemática del colesterol, enfermedades coronarias y metabólicas asociadas al consumo de grasa animal, hechos que favorecen la demanda de carnes con menor contenido graso, por parte de la población.

La Legislación ha ido avanzando hacia mayores restricciones en el uso de EAA destinados a la producción de alimentos **(16-23)**, basándose en que la utilización indiscriminada de estas sustancias puede dejar residuos, entendiéndose como tales, tanto la sustancia administrada como sus posibles metabolitos **(24)**, que pueden aparecer en la canal o en los productos cárnicos derivados **(25)**. Parece que no existen dudas sobre la prohibición de su utilización en producción animal, ya que los resultados contradictorios acerca del metabolismo y distribución de estos compuestos en los animales, así como el posible peligro potencial que el depósito de sus residuos en los tejidos comestibles, puede representar para los consumidores **(26)**. Esto ha llevado a las autoridades sanitarias de numerosos países a considerar estos fármacos de uso ilegal **(17,19,23)**, hasta que no estén suficientemente aclaradas las dudas al respecto. Además, el uso de EAA como agentes terapéuticos se está restringiendo cada vez más para determinadas especies en toda la Unión Europea (UE) **(21,22)**, lo que ha dado lugar a la presentación de alegaciones jurídicas por parte de los laboratorios productores de estos fármacos ante el Alto Tribunal de Justicia de Bruselas. Por ejemplo, existen estudios como los aportados por Kearns **(27)**, realizados en la especie equina, que han demostrado que la administración crónica de clenbuterol a dosis terapéuticas tiene efecto promotor de crecimiento. Esto podría hacerse extensivo a otras especies de animales y refuerza aún más las restricciones en el uso de EAA como agentes terapéuticos.

La administración de EAA en las especies animales de producción constituye un gran riesgo tanto para la salud y el bienestar animal, como para los consumidores, que son expuestos al consumo involuntario de estas sustancias en concentraciones farmacológicamente activas **(28,29)**, ocasionando una serie de problemas relacionados con la salud pública en diversos países. En España entre 1989 y 1995, se produjeron intoxicaciones por consumo de hígado con residuos de clenbuterol **(30)**. Sin embargo, no existen aún datos, ni científicos ni epidemiológicos, concluyentes de que el clenbuterol fuera el único causante de estas intoxicaciones **(31,32)**, sino que el acumulo de otras sustancias que se administran de forma fraudulenta al ganado durante el periodo de cebo, principalmente corticoides e implantes de anabolizantes naturales o sintéticos **(33)**, potenciando su toxicidad. Los primeros estudios que confirman esta hipótesis han sido publicados por Abraham **(34)**.

En resumen, la UE **(22)** así como el gobierno español **(18)**, en 1988 establecen la prohibición de la utilización de determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático, así como sustancias β -antagonistas (estrogénicas, androgénicas o gestágenas) de uso en la cría de ganado, es decir, su prohibición incluyendo el agua y piensos para animales, así como en todos los lugares en que se críen o mantengan los mismos.

I.2.6. Efectos

Los efectos de los EAA sobre el atleta y su actuación restan controversia, no observándose efectos que beneficien su metabolismo aeróbico (9). Los cambios posteriores a su administración incluyen un incremento de la sensación de bienestar, energía, agresividad, sexualidad e imprevisibilidad. Se han realizado numerosos estudios acerca de su efecto sobre la corpulencia y fuerza, pero sin conclusiones definitivas. Según algunos autores, los EAA provocan aumento de fuerza cuando se administran a atletas entrenados intensivamente en levantamiento de peso antes de comenzar un régimen de anabolizantes y que continúan entrenando durante este régimen; manteniendo una dieta alta en proteínas; y si los cambios en la fuerza son medidos por la técnica repetición-máximo peso.

La dosis, tipo y duración del uso, dieta, estado de entrenamiento anterior a su uso, método de evaluación de fuerza y método de medida de la composición del cuerpo representan algunas de las confusas variables. En vista de sus efectos tóxicos, particularmente de las dosis largas empleadas por los atletas, el efecto de su actuación continuará siendo una fuente de controversia y especulación.

Son posibles un número de explicaciones atribuibles a los anabolizantes tales como el incremento de la agresividad y motivación; el efecto anticatabólico (contrario al efecto catabólico de los corticoides); el incremento de la utilización de las proteínas resultando un balance de nitrógeno positivo (crecimiento muscular).

El uso de patrones para evaluar la eficacia de los EAA ha tenido su efecto sobre la habilidad de levantar el máximo peso en una sencilla repetición. En algunos deportes, el incremento del volumen corporal, bien sea a partir del incremento de masa o bien por la retención de fluidos, generalmente puede impedir la acción, particularmente donde se requiere coordinación de movimientos musculares y flexibilidad (4,5). Legalmente, cualquier beneficio potencial que pueda derivarse de los EAA en las competiciones atléticas debe ser juzgado frente a sus reales y potenciales efectos secundarios. Los atletas a menudo antes de una competición, combinan EAA orales y parenterales para que la media de droga empleada exceda las dosis clínicas, además de incrementar los efectos secundarios. Muchos de los datos relativos a los efectos secundarios se derivan de estudios con los usuarios que ingieren las drogas en dosis recomendadas por los médicos (3,9).

El efecto secundario más significativo del abuso de los EAA es la reducción del colesterol. Este efecto ocurre en cuanto comienza el uso de los esteroides y normalmente subsiste alrededor de un mes. La reducción del colesterol de alta densidad se acompaña a menudo con aumento de colesterol de baja densidad. Esta desorganización del balance de colesterol sugiere que los atletas que emplean estas hormonas corren un gran riesgo de sufrir alguna enfermedad coronaria. El uso prolongado de estas hormonas se asocia con tumores en el hígado y riñón, peliosis hepática, también interfiere con la espermatogénesis y puede derivar en azoospermia y atrofia testicular (4,5). También pueden producir adicción y dependencia, tanto física como psicológica, con síntomas que incluyen depresión, fatiga, descenso del impulso sexual, insomnio y anorexia, pudiendo producirse durante la fase inicial de su retirada: ansiedad, irritabilidad, náuseas, dolor de cabeza, mareos, escalofríos y sudoración (8). Entre otros efectos se incluyen: agresividad incontrolable, esquizofrenia, ataxia, virilización, hirsutismo, clítoromegalia y agravamiento de voz, quistes sebáceos, y rupturas tendinosas (1).

I.3. CORTICOIDES

I.3.1. Historia

Se han realizado innumerables estudios donde se demuestran los beneficios de los corticoides (CC), así como las desventajas de usarlos en la artritis reumatoide (AR) y otras enfermedades inflamatorias (35-37). Tras varios estudios médicos, Philip Hench y col. consideraron que existía una sustancia X, que podría ser una hormona común a ambos sexos, que era la responsable del efecto antirreumático y antialérgico (38-40) en las pacientes embarazadas o con ictericia.

En 1948, Kendall y Mason, lograron sintetizar una pequeña cantidad de acetato de cortisona llamada "*Componente E*" derivada de la bilis. En ese mismo año, Hench y col. utilizaron la cortisona como tratamiento para la AR con excelentes resultados. Observaron y describieron la mejoría de las manifestaciones esqueléticas y la recaída del paciente al suspender la cortisona, esto les mereció el Premio Nobel de Medicina en 1950 (41-46).

En 1949, Hench, Slocumb y Polley utilizaron otro CC que se denominó "*Compuesto F de Kendall*" (hidrocortisona o cortisol) para tratar un paciente con AR, observando efectos comparables al "*Compuesto E*" y a la adrenocorticotropina (ACTH) (47).

En 1950, L. Soffer, M. Levitt y G. Baehr (48) utilizaron cortisona y ACTH en 34 pacientes con varias enfermedades (lupus, hipertiroidismo, poliarteritis, AR, dermatomiositis, síndrome nefrótico, pénfigo, esclerodermia, fiebre reumática). La mejoría se presentó rápidamente con la mayoría de los síntomas. Este grupo de investigadores describió por primera vez las complicaciones de los CC como hipertensión, depresión, pigmentación, hirsutismo, estrías, insuficiencia cardíaca congestiva, alcalosis y diabetes.

En 1954, Soffer, Elster y Hamerman (49) informaron sobre 32 pacientes cuyas edades oscilaban de 11 a 60 años (6 hombres y 26 mujeres) tratados con cortisona y ACTH, describieron otros efectos secundarios tales como infecciones, síndrome de Cushing, acné, alopecia, hirsutismo, alcalosis metabólica, estrías abdominales, diabetes, úlcera péptica y mencionan por primera vez 3 casos de osteoporosis.

Con el entusiasmo por los efectos anti-inflamatorios de la cortisona, también creció el desencanto por los efectos potencialmente serios e indeseables. No obstante la importancia del descubrimiento de los CC va mucho más allá del interés como antirreumático. Este hecho cambió para siempre la investigación médica y abrió las puertas a la investigación de la inflamación e inmunología con la participación de la bioquímica y la genética en las enfermedades reumáticas.

I.3.2. Biosíntesis y metabolismo

La biosíntesis comienza por la escisión de la cadena lateral del colesterol para dar lugar a la pregnenolona. Para ello, el colesterol entra en la mitocondria, una monoxigenasa hidroxila en posiciones 20 y 22 y, finalmente, una desmolasa elimina un resto de aldehído isocapróico. Esta etapa es la limitante en la biosíntesis de esteroides, actuando incluso la pregnenolona como retroinhibidor de la hidroxilación del colesterol (50). Una vez formada la pregnenolona, ésta se transforma en progesterona por deshidrogenación y transposición. Posteriormente, por hidroxilación en 17 α , 21 y 11 β se origina el cortisol (Fig. 10).

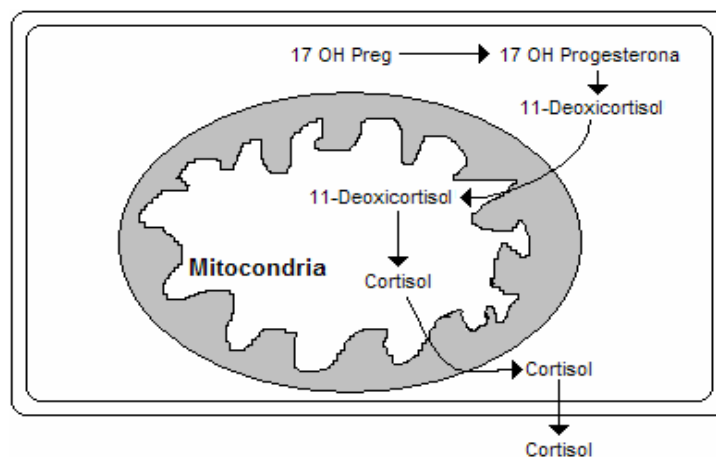


Fig. 10. Biosíntesis del cortisol en la mitocondria.

Una vez sintetizado el colesterol, la síntesis de CC puede seguir varias rutas metabólicas (**Fig. 11**). Cada paso de la cadena es catalizado por una enzima que va transformando cada CC en el siguiente, hasta llegar al esteroide final de la cadena. Una vez sintetizados, no se acumulan en la corteza suprarrenal en grandes cantidades, sino que se segregan según las necesidades, estando su síntesis y secreción regulada por la ACTH. Una vez secretados, los CC circulan en el organismo ligados a la globulina, que se conoce con el nombre de *globulina enlazante de CC* y, en menor proporción, a la albúmina. Sólo la fracción libre de los CC es activa farmacológicamente. A su paso por el hígado, los CC son inactivados por reducción a sus tetrahydroderivados, los cuales, se conjugan con el ácido glucurónico. Tanto los CC libres como los conjugados son excretados al intestino con la bilis, y en parte son reabsorbidos en él, pasando a la circulación enterohepática. En el riñón tiene lugar la excreción de los CC libres y en particular de los conjugados.

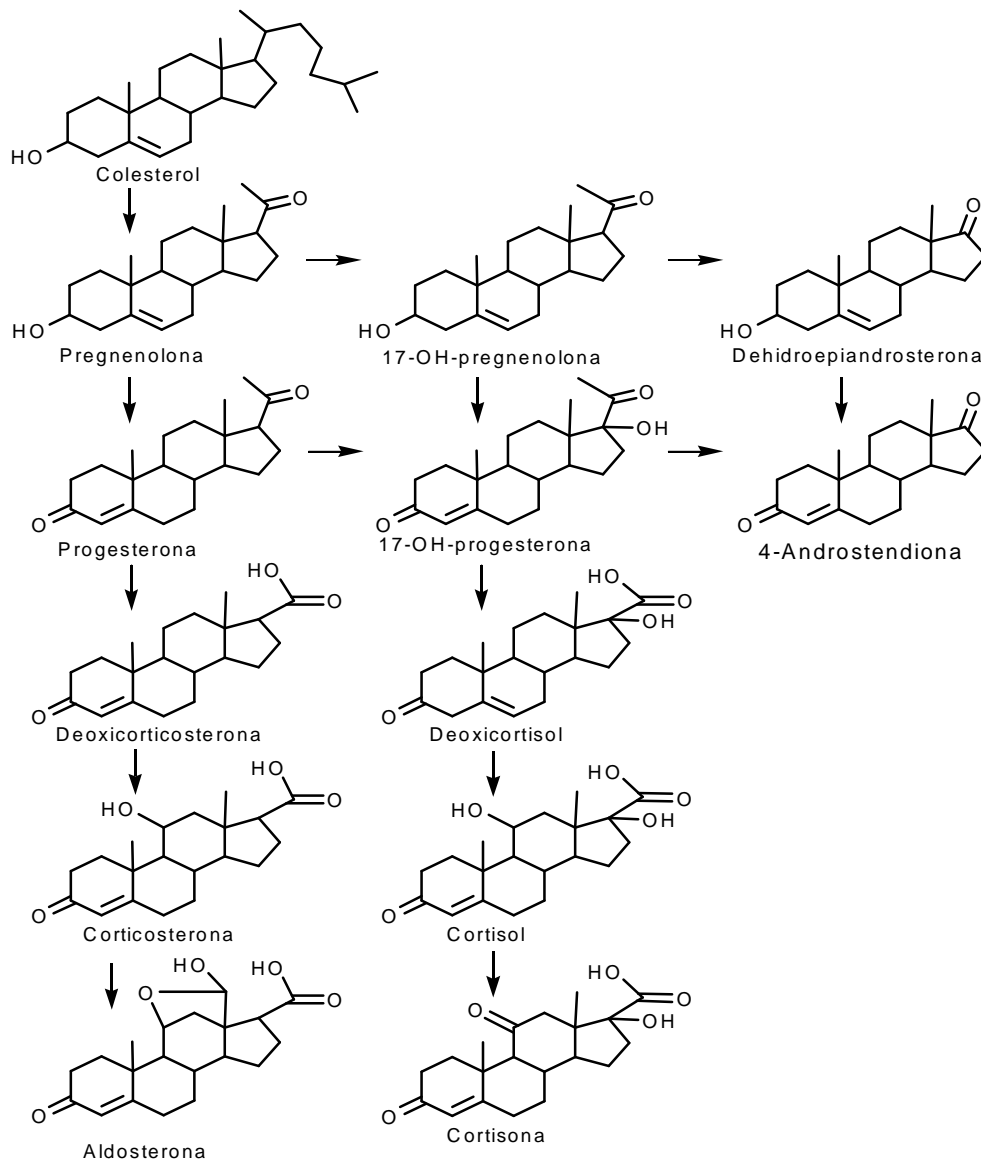


Fig. 11. Biosíntesis de los CC adrenales.

I.3.3. Corticoides sintéticos

Las modificaciones estructurales más importantes de los CC se remiten a (**Fig. 12**):

- La introducción de un doble enlace a nivel de los carbonos 1 y 2, aumentando la actividad glucocorticoide (prednisona y prednisolona). Los esteroides que llevan esta modificación se conocen como deltacorticoides.
- La presencia de un grupo metilo en posición 6 α incrementa la actividad glucocorticoide y disminuye la mineralocorticoide (metilprednisolona).
- La introducción de átomos de flúor en posición 6 α y 9 α incrementa la actividad glucocorticoide y anula la mineralocorticoide.
- La introducción adicional de un grupo metilo o hidroxilo en posición 16 α o 16 β , aumenta la actividad anti-inflamatoria (dexametasona, betametasona).

Las situaciones a las que se puede llegar son múltiples, y las características dependen de la influencia de los radicales introducidos en la molécula y, en general, son difíciles de predecir.

Los siguientes corticoides sintéticos carecen de actividad mineralocorticoide: metilprednisolona, betametasona, dexametasona, parametasona y triamcinolona. El aumento de actividad glucocorticoide coincide con la utilización de dosis menores de dichos compuestos, pero a pesar de ello algunos efectos adversos de los CC aparecen en dosis muy bajas (51).

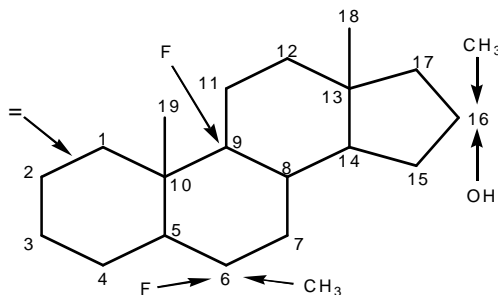


Fig.12. Obtención de corticoides sintéticos.

I.3.4. Fisiología

Los CC naturales más importantes son cortisol, corticosterona y aldosterona (Fig. 11). Estas hormonas son imprescindibles en circunstancias en las que el organismo está sometido a situaciones de estrés (2). La Tabla 3 muestra la tasa de secreción y concentración plasmática de estos corticoides.

Tabla 3. Tasa de secreción y concentración plasmática de algunos CC.

Corticoides	Secreción (ng/día).	Concentración Plasmática (ng/100mL).
Cortisol	20000	150
Corticosterona	3000	3
Aldosterona	2000	1.8

En general, los CC ejercen una acción antagonista respecto a la insulina y actúan aumentando la glucosa plasmática. Además catabolizan las proteínas para formar aminoácidos y producen un incremento neto de los niveles séricos de ácidos grasos para que éstas sean utilizadas como fuente energética. Otras funciones de los CC adquieren importancia en los estados de deficiencia o excesos relativos de los mismos (52,53).

Son capaces de suprimir las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Este mecanismo se lleva a cabo mediante la reducción selectiva de linfocitos-T en relación a los de tipo B, linfocitopenia y neutrofilia, con un incremento de la liberación de neutrófilos de la médula ósea y mayor acumulación de estos en los sitios inflamados (53). Debido a estos efectos, son las drogas más utilizadas para atenuar la respuesta inflamatoria, la reacción de rechazo a un transplante y para el tratamiento de las enfermedades auto-inmunes. Otros efectos de estas hormonas incluyen la osteoporosis, inhibición de fibroplastos, etc, dando lugar a la aparición de lastimaduras y deficiencias en la curación de heridas.

I.3.5. Aplicaciones

Principalmente se administran para reemplazar las hormonas necesarias en pacientes que no las segregan en cantidad adecuada, inhibir la secreción pituitaria de la ACTH, suprimir las reacciones inflamatorias, minimizar la respuesta inmune a una variedad de antígenos (2,54) y mejorar las prestaciones de deportistas (“doping”).

I.3.5.1. Clínicas

Los CC están implicados en una variedad de mecanismos fisiológicos, incluyendo aquellos que regulan la inflamación; el sistema inmunológico; el metabolismo de hidratos de carbono, catabolismo de proteínas y lípidos; los niveles líquidos y electrolíticos en plasma y preservación de la función normal de los sistemas cardiovascular e inmunológico, riñones, músculo estriado, así como los sistemas endocrino y nervioso. Además, por mecanismos que no se entienden por completo, permiten al organismo resistir circunstancias que generan estrés, como estímulos nocivos y cambios ambientales. Tienen muchas aplicaciones clínicas, utilizándose principalmente debido a sus propiedades antiinflamatorias, inmunosupresoras y a sus efectos sobre el metabolismo (4,5).

I.3.5.2. En el deporte

Según algunos autores, son el actual sustituto de las anfetaminas en los deportes que requieren grandes esfuerzos (2,54). El atleta que utiliza CC, creyendo así aumentar su rendimiento, lo hace a dosis muy elevadas, porque de otra forma no consigue el efecto deseado y, además, no cesa de administrarlos hasta que termina la competición. Esto genera la supresión del eje hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal y la aparición de psicopatías. Además las consecuencias del uso de CC se pueden observar especialmente sobre el estado de ánimo y la conducta. En resumen, el consumo de CC, además de ser indeseable, es peligroso para el deportista.

Si el atleta utiliza CC naturales es muy difícil demostrarlo. Sin embargo, si utiliza CC sintéticos su control es posible. El reto actual está en poner a punto métodos criba y de preparación de muestra con objeto de poder detectarlos en diferentes fluidos biológicos. Incluso se han encontrado indicios de su utilización en el ciclismo (55).

Según el BOE 27 Diciembre de 2006 (Real Decreto 2269-8/2006) el uso de CC por deportistas está prohibido por vía oral y parenteral, autorizándose su uso, a dosis terapéuticas en aplicaciones locales, mediante inhalación (para tratamientos de asma y rinitis alérgica) y en inyecciones peri e intra articulares. Cuando el médico responsable del deportista considere justificada su administración deberá comunicarlo por escrito previamente (10).

I.3.5.3. Como promotores de producción de carnes

En muchos países se utilizan EAA para engordar el ganado, aunque recientemente este uso ha disminuido, debido a que se realizan análisis rutinarios para detectarlos. Por esta razón se han ido sustituyendo por otros *promotores de crecimiento* como los CC, ya que inducen un efecto de retención de agua en el organismo provocando un aumento de peso (**56-63**). La Comisión Reguladora de la UE (CRUE) ha regulado el uso de los CC sintéticos como medicamento veterinario siendo necesario el desarrollo de métodos específicos y sensibles para su identificación y cuantificación en diferentes tejidos y fluidos biológicos (**59**). Se utilizan tanto en piensos (**64**) como en “cocktails” fraudulentos (**65,66**). En torno al control y análisis de alimentos, en el caso de la DM, el artículo de la CRUE en 2002 especificaba límites de 0.3 ppb en leche, 0.75 ppb en músculo y riñón y 2.0 ppb en hígado de ganado destinado a consumo humano (**67,68**). Sin embargo, a partir de 2004 la CRUE y el gobierno español prohibieron el uso de cualquier tipo de CC (**17,20,23**).

Estos compuestos también son usados como adulterantes en extractos de hierbas y en ciertas drogas homeopáticas (**69**). En otros casos, se sustituye de forma fraudulenta BM por DM, ya que la BM es bastante más cara que la DM, siendo, por tanto, de suma importancia su determinación simultánea. El uso de la DM está muy extendido en los deportes hípicos, siendo un problema analítico la determinación en fluidos biológicos, ya que su administración se da en dosis bajas. Los CC sintéticos son considerados sustancias prohibidas bajo la reglamentación de las carreras de caballos (**70-76**).

Por estos motivos se hace necesario el desarrollo de métodos de análisis rápidos y eficaces que permitan la detección y cuantificación de estos compuestos en diferentes tipos de muestras de interés.

I.3.6. Efectos

La acción farmacológica de los CC se caracteriza básicamente por (**1-4**):

- Aumentar la gluconeogénesis, hiperglucemia y glucosuria.
- Producir hiperaminoacidemia.
- Favorecer la liberación de ácidos grasos.
- Aumentar la retención de sodio y la excreción de potasio y calcio.
- Producir un efecto anti-inflamatorio. La reacción anti-inflamatoria de los CC consiste en cambios vasculares locales, movilización de las células anti-inflamatorias hacia la herida y mecanismos complejos inmunes.
- Producir una acción antialérgica (aunque ésta es tisular), tratándose de fenómenos supresores transitorios, pudiendo producirse una recaída al cesar la medicación.
- Producir un efecto inmunosupresor. Los CC hacen que aumente el número de receptores esteroideos en células sensibles, pero éstas no tienen respuesta. Modulan la formación de anticuerpos.

- Producir atrofia de la piel y dar lugar a la aparición de estrías rojo-purpúreas en abdomen, senos, muslos, etc... (en dosis elevadas y en tratamiento continuado).
- Mejorar la debilidad muscular presente en animales adrenalectomizados y en pacientes addisonianos. Administrados en dosis elevadas pueden dar lugar a debilidad muscular, debido a la pérdida de potasio y a su acción antianabólica. Además, alteran el metabolismo del calcio, reduciendo su absorción y facilitando su eliminación (también se incrementa la eliminación de fosfato). La administración continuada de CC retrasa la consolidación de las fracturas, en parte como consecuencia de su efecto sobre el metabolismo del calcio y a sus acciones antianabólicas.
- Producir euforia, insomnio, intranquilidad e incremento de la actividad motora y del apetito a nivel del sistema nervioso central.
- En el metabolismo intermedio, al administrar dosis elevadas de CC, se produce un aumento de la ruptura de proteínas, de la concentración de glucosa e insulina, y de la excreción urinaria de acetona.
- En el tracto intestinal, en dosis altas los CC aumentan la úlcera péptica, debido a que producen un aumento de la secreción de jugo gástrico.
- Además de los efectos en las células secretoras de la ACTH de la pituitaria y en los neurotransmisores, los CC parecen potenciar los efectos β -adrenérgicos de las catecolaminas, inhibiendo la síntesis de epinefrina.
- En las funciones cardiovasculares, tanto la hiperfunción como la hipofunción adrenocortical, causan enfermedades de los músculos estriados.
- En su ausencia causan problemas metabólicos como hipoglucemia y disminución del glucógeno hepático y muscular.
- El exceso o defecto de CC pueden producir alteraciones en el estado emocional y en la conducta.

I.4. ASPECTOS INHERENTES AL ANÁLISIS DE ESTEROIDES EN PIENSOS

I.4.1. Componentes

El número de componentes utilizados para la alimentación del ganado es muy elevado, existiendo una considerable variabilidad tanto en su composición química como en su valor nutritivo, como consecuencia de factores ligados a su producción o procesado. En la práctica, sin embargo, cada país recurre a la utilización de una gama más limitada de materias primas. Esta situación justifica la elaboración de tablas nacionales de referencia adaptadas a las especificidades de cada sistema de producción (77). La **Tabla 4** muestra los componentes pertenecientes a los grupos mencionados.

Los componentes de los piensos se han clasificado en los siguientes grupos: 1) Granos de cereales, 2) Subproductos de cereales, 3) Frutos, tubérculos, melazas y vinazas, 4) Alimentos fibrosos, 5) Concentrados de proteína animal, 6) Concentrados de proteína vegetal, 7) Grasas y aceites, 8) Minerales y 9) Microcomponentes.

Tabla 4. Componentes más comunes de cada grupo.

1	4	6	8
Avena	Alfalfa	Semilla de algodón	Ácido fosfórico
Cebada	Cáscara de algodón	Harina de algodón	Bicarbonato sódico
Centeno	Cascarilla de avena	Harina de cacahuete	Calcita mineral (CaCO ₃)
Maíz	Cascarilla de girasol	Harina de coco	Carbonato dolomítico
Maíz rico en aceite	Cascarilla de soja	Semilla de colza	Cloruro de magnesio
Sorgo	Garrofa	Harina de colza	Cloruro sódico
Trigo blando	Granilla sin grasada	Semilla de girasol	Conchillas de moluscos
Trigo duro	Hojas de olivo	Harina de girasol	Conchillas de ostras
Triticale	Hollejo de uva	Guisantes	F bicálcico
	Orujo de aceituna	Haba caballar	F cálcico-magnésico
2	Orujo uva	Lenteja	F cálcico-magnésico
Cilindro de arroz	Paja de cereales	Semilla de linaza	F coloidal y magnésico
Germen	Pulpa de cítricos	Harina de linaza	F mono-amónico
Gluten maíz	Pulpa de remolacha	Harina de palmiste	F mono-bicálcico
Harinillas		Proteína de patata	F mono-cálcico
Salvado	5	Harina de soja	F mono-sódico
Raicilla de cebada	Harina de carne	Proteína de soja	F Na, Ca y Mg
Tercerillas	Subproducto de aves	Proteína de trigo	Harina de huesos
	Harina de plumas	Veza común	Hidróxido de magnesio
3	Harina de pescado		Óxido de magnesio
Bellota entera	Hemoglobina	7	Sulfato magnésico y sódico
Mandioca	Plasma animal	Aceites	(F = Fosfato)
Melaza de caña	Leche descremada	Grasa hidrogenada	9
Melaza de remolacha	Suero ácido	Grasoleínas	L-Lisina
Patata	Suero dulce de vacuno	Grasa mezclada	Metionina
Batata	Suero delactosado	Grasa de pollo	L-Treonina
Vinazas remolacha	Caseína	Jabones cálcicos	L-Triptófano
		Lecitina de soja	Colina-75
		Manteca	Cloruro amónico
		Mantequilla	Urea
		Oleína	Sacarosa
		Sebo	Dextrosa
		Aceite de: algodón, cacahuete, colza, coco girasol, linaza, maíz, oliva, palma, palmiste, pescado, soja	Lactosa
			Permeato de lactosa
			Ácido cítrico
			Ácido fumárico
			Ácido propiónico

La composición media (información proporcionada por los laboratorios ALKEMI, S.A.y NUTRAL, S.A.) considerando un total de 21 piensos destinados a cerdos, cerdos cebo, corderos, corderos lactantes, gallinas ponedoras, pollos, terneros, terneros lactantes, y vacas se exponen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Composición media de piensos.

Humedad % (m/m)	Proteínas % (m/m)	Grasas % (m/m)	Fibra % (m/m)	Almidón % (m/m)	Calcio % (m/m)	Fósforo % (m/m)
10.97 ± 0.98	17.03 ± 1.89	3.99 ± 1.34	5.01 ± 2.12	41.22 ± 3.41	1.06 ± 0.5	0.49 ± 0.06

I.4.2. Utilidad del análisis

Debido a la gran variedad de piensos, la utilidad del análisis reside en la determinación de sus componentes para confirmar el valor nutricional del pienso adquirido. También, debido al riesgo intrínseco en la salud del animal y del humano (**I.2.6, I.3.6**) es estrictamente necesario el control del dopaje con hormonas esteroideas, usadas como promotores de crecimiento, en piensos y aguas de consumo animal (**2**). Sin embargo, el análisis de esteroides en piensos es una tarea muy difícil debido a la gran complejidad de la matriz (variedad de tipos y componentes) y a que las posibles interferencias varían en función de la composición del pienso (**I.4.1**). Generalmente, los controles de este tipo se llevan a cabo con técnicas cromatográficas acopladas a distintos detectores, siendo el grado de purificación de la muestra de pienso dependiente del tipo de detector que se utilice. Las técnicas más utilizadas son LC-DAD, LC-MS, GC-FID y CG-MS (**II**). Con el propósito de eliminar las interferencias de la matriz sin perder a los analitos, se aplican todas las herramientas posibles en el tratamiento de muestra tales como extracción en fase sólida, extracción líquido- líquido, etc (**I.6**).

I.5. OPTIMIZACIÓN SISTEMÁTICA DE SEPARACIONES POR HPLC

La separación es uno de los pasos más importantes del método a desarrollar. Dependiendo del caso estudiado, se aplican varios procedimientos de optimización, teniendo en cuenta los objetivos y los antecedentes bibliográficos (**9**). El principal objetivo es obtener una separación adecuada empleando el menor tiempo y esfuerzo posibles. Para ello es necesario utilizar alguna aproximación sistemática general que sea aplicable a la mayoría de las muestras.

El desarrollo del método cromatográfico comprende los siguientes pasos (**78**):

- 1) *Selección del modo de elución*: Teniendo en cuenta el tipo de muestra se selecciona elución: isocrática o gradiente.
- 2) *Optimización*: Se optimizan tres características principales: Retención: Se obtiene un cromatograma donde los compuestos a separar aparezcan como picos estrechos, simétricos y con tiempos de retención en un intervalo adecuado, Selectividad (α): Debe buscarse la máxima selectividad dentro de los tiempos óptimos de retención y Eficiencia: Se selecciona la columna más adecuada y el resto de condiciones (e.g. temperatura, flujo, etc).
- 3) *Validación*: Se verifica si el método cumple los requisitos analíticos.

1.5.1. En isocrático

En principio, la separación se lleva a cabo con un disolvente fijo, ajustando su porcentaje de manera que la retención sea satisfactoria ($0.5 < k < 20$).

En el caso de muestras neutras se incluyen los siguientes pasos (79):

- 1) Ajuste del porcentaje de modificador orgánico (%B) para $0.5 < k < 20$ (preferiblemente $1 < k < 10$).
- 2) Revisión del número de platos/colas de picos.
- 3) Ajuste de la selectividad, si fuera necesario, incluyendo:
 - a. *Ajuste fino del porcentaje de modificador orgánico.*
 - b. *Cambio de modificador orgánico.*
 - c. *Mezcla de modificadores orgánicos.*
 - d. *Efecto de la fase estacionaria.*
 - e. *Efecto de la temperatura.*
 - f. *Efecto del pH.*
- 4) Optimización de las condiciones de la columna (longitud, tamaño de partícula, flujo).

1.5.1.1. Ajuste de la selectividad

Una vez establecido el %B, para mejorar la separación es necesario ajustar la selectividad (para reducir el tiempo de análisis o mejorar la resolución), estudiando:

a) Influencia de la fuerza del disolvente

Se puede modificar la selectividad mediante un cambio de la fuerza del disolvente. Una gran ventaja de esta aproximación es que se puede hacer variando la concentración de disolvente mientras se ajusta para una retención de la muestra óptima, por lo que requiere un esfuerzo mínimo.

b) Influencia del tipo de disolvente

Un cambio en el disolvente orgánico (%B) es empleado para variar el espacio entre picos y mejorar la resolución. La selección de los distintos disolventes está basada en las propiedades que pueden afectar a la selectividad: acidez, basicidad y polaridad. Los disolventes se clasifican según sus propiedades utilizando un triángulo de selectividad del disolvente, aunque usualmente se empleen tres disolventes para desarrollar un método cromatográfico: acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y tetrahidrofurano (THF), ya que proporcionan los mayores cambios en selectividad. Estos disolventes son miscibles en agua y difieren de manera significativa en sus propiedades, siendo aceptables en términos de absortividad molar en el UV y viscosidad.

El cambio de tipo de disolvente es el procedimiento más efectivo para cambiar la selectividad y llegar a la separación de muestras neutras multicomponente. Son necesarios un número mayor de experimentos pero los cambios en la selectividad son mayores.

Cuando sólo se tiene que optimizar una variable en un método de HPLC, como por ejemplo el modificador orgánico se puede aplicar el método de diagrama de ventanas (80). Esta aproximación describe el comportamiento de la respuesta $\ln k$ en función de la variable estudiada (modificador orgánico). Cuando esta implicada más de una variable, se aplican métodos más complejos (81,82). En el caso particular de la optimización de la composición de la fase móvil donde las variables examinadas son fracciones de 3 disolventes, se aplica normalmente un diseño de mezclas (83,84).

En HPLC, los criterios de optimización más comunes para describir la separación entre dos compuestos son el coeficiente de selectividad (α) (Ec. 1) o la resolución (R_s) (Ec. 2) (85).

$$\alpha = \left(\frac{k_{i+1}}{k_i} \right) \quad (\text{Ec. 1}) \qquad R_s = 1.18 \left(\frac{t_{R_{i+1}} - t_{R_i}}{W_{i+1} + W_i} \right) \quad (\text{Ec. 2})$$

$i = 1, 2, \dots, n$

donde k representa el factor de retención, t_R el tiempo de retención y W la anchura de pico a media altura.

En un diagrama de ventanas el comportamiento del $\ln k$ de los analitos en función de la fracción de volumen de modificador orgánico, ϕ , en la fase móvil se acerca a la linealidad (86):

$$\ln K = \ln K_w - S\phi \quad (\text{Ec. 3})$$

donde k_w es el valor teórico para una fase móvil compuesta de agua y S una constante para un analito dado.

Basado en esto, con sólo dos experimentos es suficiente para la primera predicción de la máxima separación en el intervalo definido por estos dos experimentos. La representación gráfica (α vs. %B) muestra el valor de α para el par de compuestos menos separados en función de la composición de la fase móvil. Las condiciones seleccionadas como óptimas corresponden al valor más alto de α , aunque el valor seleccionado puede no ser el de mayor robustez y haber pequeñas variaciones en la composición de la fase móvil. Para resolver este problema se tiene en cuenta R_s .

c) Empleo de mezclas de disolventes orgánicos

Este procedimiento mantiene constante la fuerza del disolvente mezclando MeOH, ACN y THF en todas las proporciones posibles. Si en primer lugar se ha ajustado un porcentaje de modificador fijo (%ACN) y la separación no ha sido la adecuada, se realizan experimentos posteriores con otros disolventes (MeOH y THF) con fases móviles que proporcionen tiempos de análisis similares. Se identifica cada compuesto en el cromatograma y se anotan las variaciones de k .

El método propuesto por Glajch y col. (80,86) se basa en lo anterior, situando las fases binarias en los vértices de un triángulo obteniendo un amplio intervalo de selectividades. A partir de estas fases móviles, se ensayan mezclas ternarias (MeOH/ACN/H₂O, MeOH/THF/H₂O y ACN/THF/H₂O) compuestas de las binarias. Con un criterio adecuado, se calcula la composición de la fase móvil ternaria que proporcione la mejor separación.

La muestra se analiza mediante la fase móvil óptima predicha para verificar la calidad del cromatograma. Los cálculos se repiten para encontrar una nueva fase óptima hasta que se consigue la mejor separación posible, o no hay más cambios en la composición óptima. El procedimiento se puede completar con pocos experimentos. Para la evaluación completa de la selectividad del triángulo en el método propuesto por Glajch, se necesitan al menos 7 experimentos: Tres fases binarias, tres fases ternarias mezclando las binarias al 50% (punto medio de los lados) y una cuaternaria mezclando las ternarias en partes iguales (baricentro del triángulo). La evaluación cualitativa de los 7 cromatogramas obtenidos se utiliza para definir una región de composición óptima en el triángulo. Esta región se puede estrechar realizando aproximaciones sucesivas de la composición por interpolación. Por otro lado, la evaluación cuantitativa de los 7 cromatogramas se puede analizar mediante un programa de ordenador para obtener un mapa de resolución y predecir así la composición óptima de la fase móvil, con la mejor resolución posible.

Previo a la elección del criterio de optimización, se ha de tener en cuenta el tipo de muestra a analizar. Éstas se clasifican en: fáciles, intermedias y complejas, según sea necesario para su separación la optimización de un vértice, tres o bien todo el triángulo, respectivamente.

d) Efecto de la fase estacionaria

La retención de la muestra depende de tres características de la columna: tipo y concentración de la fase ligada y área de la superficie. La retención varía con la naturaleza de la fase ligada y generalmente aumenta cuando la hidrofobicidad del grupo de la fase ligada o longitud de la cadena aumenta (disminución de polaridad). Para un cambio en la selectividad se emplean columnas de diferente tipo (C_8 o C_{18} , fenil, ciano, poliméricas, etc) y es especialmente útil cuando se combina con un cambio en la composición de fase móvil.

Con los recientes avances en la fabricación de fases estacionarias durante la década pasada, los rellenos (fases estacionarias) han cambiado espectacularmente de forma irregular a forma esférica y de partículas grandes a partículas pequeñas, mejorándose las prestaciones de las columnas (87). Las columnas se pueden clasificar en dos grupos las: de partículas de base sílice y monolíticas.

- **Columnas de micropartículas de base sílica**

La selectividad de una columna depende de las propiedades (Fig. 13) (88,89):

H (*hidrofobicidad*): aumenta al aumentar la interacción del soluto con los ligandos (alquíl) de la columna. Esto implica que H aumenta al incrementarse la densidad del ligando (concentración de ligando C_L) y su longitud, especialmente para las cadenas C_8 y C_{18} .

S (*impedimento estérico*): resistencia de la fase estacionaria a la inserción de una molécula voluminosa. Aumenta de la misma forma que H. Un aumento de C_L implica un mayor impedimento estérico a la inserción de una molécula y por tanto mayores valores de S. Las terminaciones del ligando estarán más juntas a mayores longitudes de este, especialmente para partículas con poros pequeños, por tanto S aumenta al incrementarse la longitud del ligando y disminuir el tamaño de poro.

A (Acidez): atribuible principalmente a los silanoles no-ionizados. Posiblemente la diferencia de enlaces químicos involucrados en la preparación de columnas C₃, C₈ y C₁₈, así como el diámetro de poro, afectan de alguna manera a la acidez de los silanoles no-derivatizados (el efecto en A de la acidez de los silanoles es más importante que el efecto de la accesibilidad a los silanoles). Para una columna, se observa una disminución de los valores de A al disminuir la concentración relativa de silanoles no-derivatizados. Debido a razones menos obvias, incrementos en la longitud del ligando y diámetro de poro, (relacionados con la accesibilidad a los silanoles libres), conllevan a incrementos de A.

B (basicidad): atribuible a los grupos silanoles y siloxanos de la fase estacionaria. El impedimento estérico originado por los grupos del “end-capping”, disminuye la interacción del soluto con grupos silanoles o siloxanos y por tanto ocasiona una disminución de B (el “end-capping” implica un aumento de S y una disminución de B). También puede ser atribuida al agua adsorbida en la fase estacionaria. Si este es el caso, los valores de B deberían de aumentar al aumentar la concentración de agua en la fase estacionaria y, por tanto, a incrementar H.

C (interacción iónica): las columnas de sílica normalmente poseen una carga negativa como resultado de la ionización de los grupos silanoles no-derivatizados: $-\text{Si}-\text{OH} \rightarrow \text{Si}-\text{O}^- + \text{H}^+$. Los valores de C aumentan al aumentar el pH de la fase móvil debido a que aumenta la ionización de silanoles y la carga negativa de la columna.

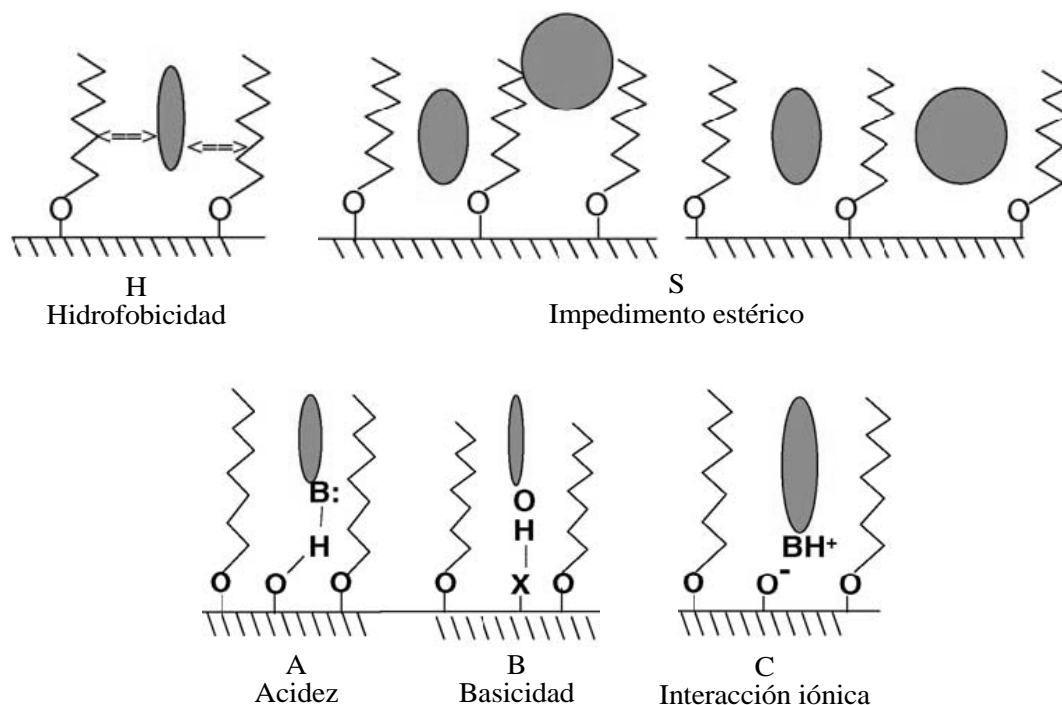


Fig. 13. Interacciones de la fase estacionaria con los solutos

De acuerdo con la pureza del relleno de base sílica se pueden clasificar en: Tipo B (sílice de alta pureza y bajo contenido de metales) y Tipo A (sílice con mayor contenido de metales que el Tipo B, mayoritariamente Al y Fe) (89,90).

Recientemente Wilson y col. han propuesto una ecuación para medir cuantitativamente la selectividad de las columnas de partículas de sílice en cromatografía de líquidos de fase reversa (91):

$$\log \alpha \equiv \log \left(\frac{K}{K_{EB}} \right) = \eta' H - \sigma' S + \beta' A + \alpha' B + \kappa' C$$

donde k es el factor de retención de un soluto, K_{EB} es el valor de k para un soluto de referencia apolar en la misma columna y bajo las mismas condiciones. El resto de los símbolos relacionados con la selectividad (η' , σ' , β' , α' , κ') representan propiedades de los solutos (empíricas o dependientes de la elución y temperatura), y propiedades de la columna independientes de la elución y temperatura (H , S , A , B , C).

En general, estas diferencias entre el Tipo A y B se pueden relacionar con los valores promedio de H , S , A , B y C (89,90). Una comparación entre ambas revela que:

- 1.- Las de Tipo A ejercen mayor retención para compuestos hidrofílicos, mientras que las de Tipo B retienen más a los solutos más hidrofóbicos o menos voluminosos.
- 2.- En las de Tipo A, los aniones y cationes se retienen mucho.
- 3.- Las de Tipo A tienden a ser más diferentes entre ellas (en términos de selectividad), por lo tanto el reemplazo de una columna de Tipo A por una columna “equivalente” podría ser inapropiado (excepto en muestras que no contengan compuestos ionizados).
- 4.- En general, las de Tipo A comparadas con las Tipo B presentan menor H y S , mayor B y mucho mayor A y C .

- **Columnas monolíticas**

Una columna monolítica (su preparación se basa en un proceso sol-gel usando tetrametoxisilano) consiste en una sola pieza sólida de adsorbente de sílice formada por estructuras pequeñas rígidas interconectadas y de mesoporos (“flow paths” trayectorias del flujo) interconectados a lo largo de la columna (87,92-96) (Fig. 14). Mediante la reducción de la difusión a través de la columna y la resistencia al flujo (alta permeabilidad), las columnas monolíticas (93,94) ofrecen nuevas posibilidades prácticas para disminuir los tiempos de retención (aumento de k) y/o incrementar la eficiencia de la columna. Tanaka y col. demostraron que las columnas monolíticas combinan poros grandes con una red de “barras” de sílice, exhibiendo alta porosidad externa y, por tanto, alta porosidad total (0.8-0.9) en lugar de 0.5-0.7 en (columnas de partículas), baja resistencia hidráulica y, también, debido a la disminución de la difusión del “path length” en la columna presenta bajas alturas de platos teóricos equivalentes a flujos altos (94,97). Por otro lado, Kele y Guiochon (95) demostraron el alto grado de reproducibilidad y eficacia de estas columnas. Estas características hacen que las columnas monolíticas sean muy atractivas para llevar a cabo separaciones a altas velocidades, especialmente para la separación de macromoléculas.

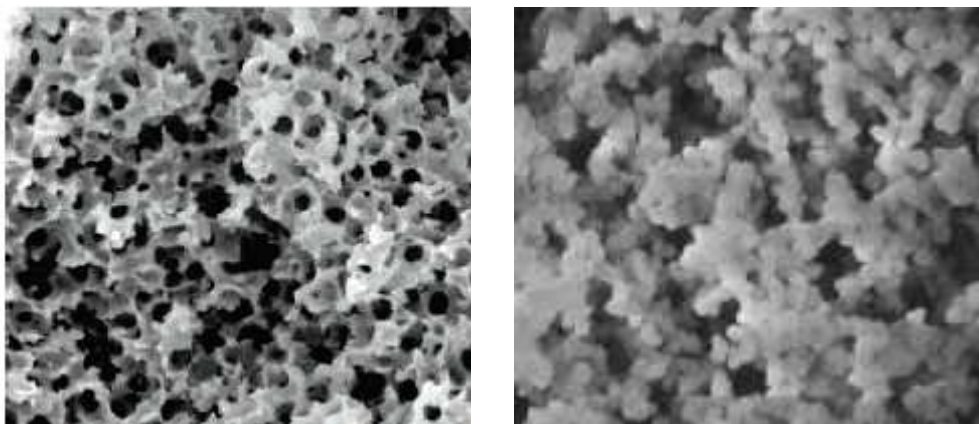


Fig. 14. Estructura de columnas monolíticas.

El paso limitante en la fabricación de columnas monolíticas de sílice es la velocidad a la que tiene que ser secada la columna. Cuando el secado es muy rápido muestran heterogeneidad, originando baja eficiencia y fragilidad de la columna. Consecuentemente, la preparación de piezas monolíticas lleva mucho tiempo y es difícil de conseguir con éxito (94). Debido a esto la longitud de las columnas monolíticas en el mercado no son superiores a 15 cm (96).

Las columnas monolíticas preparadas con materiales orgánicos comparadas con las columnas de partículas, permiten separaciones a altas velocidades de polipéptidos y proteínas en cromatografía de fase reversa y de intercambio iónico, pero generalmente presentan baja eficiencia para moléculas pequeñas (debido a la presencia de microporos en la estructura del polímero) (92,96).

Tipos de columnas monolíticas

Las columnas monolíticas se pueden clasificar, en base al material utilizado en su fabricación en poliméricas y de base sílice. También se pueden clasificar de acuerdo a su proceso de preparación en columnas de “espuma”, preparadas a partir de solventes formadores de poros mediante policondensación en presencia de polímeros solubles, y de base de partículas aglomeradas mediante el proceso sol-gel (87,95). La mayor desventaja de estas columnas es la inestabilidad del monolito a temperaturas mayores a 45° C, el uso de disolventes orgánicos (e.g. THF), pHs ácidos (menores a 2) y básicos (mayores a 7.5) (98).

Columnas monolíticas poliméricas

Las columnas monolíticas poliméricas consisten en esqueletos (estructuras) del orden de micrómetros y poros a lo largo de la estructura formando canales. El material de soporte generalmente ésta químicamente ligado a las paredes de la columna en capilares de sílice. La característica más importante es la posibilidad de variar la relación del tamaño de poro/tamaño del esqueleto, consiguiéndose mayor estabilidad del soporte de las paredes de la columna. El tamaño de los poros se puede hacer similar o más grande que los esqueletos, resultando un valor alto de relación (tamaño de poro/tamaño de esqueleto) y, por tanto, valores mayores de k y menor difusión.

Columnas monolíticas de base sílice

Las columnas monolíticas de base sílice (4.6-7 mm de diámetro interno) comparadas con las columnas convencionales de partículas, presentan mayor eficiencia y menores presiones especialmente a flujos altos. La estructura de redes de sílice (sistema esponjoso), permite altos valores de relaciones de (tamaño de poro/tamaño de esqueleto). Comparadas con las columnas convencionales de partículas, los caminos de flujo (“flow paths”) disminuyen en un factor de 10 el aumento de presión. Esto parece ser una buena opción para incrementar en un factor de 10 el número de platos usando el mismo sistema cromatográfico.

e) Efecto de la temperatura

La temperatura es una variable que hay que controlar para mantener constante la retención.

Los valores de k disminuyen típicamente a temperaturas altas para la separación de compuestos neutros. Sin embargo, los cambios en la selectividad con la temperatura son menores que con otras variables (79).

La dependencia de la retención con la temperatura nos puede proporcionar información de valor sobre el mecanismo de retención a temperaturas menores de 90 °C en HPLC-fase reversa y viene dada por la ecuación de Van't Hoff:

$$\ln k = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi$$

Ec. 4.

donde ΔS y ΔH son las variaciones de entropía y entalpía de transferencia del soluto entre la fase móvil y la estacionaria, respectivamente; T es la temperatura absoluta; R la constante universal de los gases y ϕ es la relación de volúmenes de fases (fase estacionaria/fase móvil). A partir de esta expresión y representando $\ln k$ frente a $1/T$ (representación de Van't Hoff) se pueden obtener rectas de pendientes ($-\Delta H/R$) y ordenadas ($\Delta S/R + \ln \phi$). Conociendo ϕ , se pueden obtener las constantes termodinámicas. Sin embargo, un comportamiento no lineal puede ser indicativo de que el mecanismo de retención cambia, debido a un cambio en la fase estacionaria (99).

Al incrementarse la temperatura, disminuyen los tiempos de retención, aunque se mejore o no la resolución. Debido a esto, la utilidad de la temperatura como factor para mejorar la separación es un poco dudosa. Sin embargo, algunos investigadores han reportado incrementos en la resolución generados por incrementos en la eficiencia de pico (100).

En general, se observan mayores cambios de selectividad para compuestos iónicos, polares y particularmente intensos para moléculas grandes (como proteínas) que pueden presentar diferentes configuraciones dependiendo de la temperatura. Incluso en casos en los que el efecto de la temperatura en la selectividad es nulo, la reducción del tiempo de análisis es una razón para considerarla como un factor de optimización (100).

f) Efecto del pH

Cuando la muestra analizada contiene uno o más compuestos con comportamiento ácido-base, el pH es un factor importante al optimizar la selectividad y, por tanto, útil para mejorar la resolución. La retención de compuestos iónicos está regida por la ecuación:

$$k = \frac{k_A + k_{HA} K[H^+]}{1 + K[H^+]}$$

donde k_A y k_{HA} son los factores de retención de la especie básica y ácida, respectivamente y K es la constante de protonación. Al ser diferente la retención para cada especie, a valores de pH cercanos al pK se observa un cambio en la retención. Dependiendo de la carga de las dos especies, con el cambio de pH, la retención disminuirá, aumentará o se mantendrá constante (**101**).

El proceso de protonación para dichos compuestos abarca varias unidades de pH y el valor en el que la retención cambia depende del pK. Sin embargo, cuando el rango de pH de trabajo de la fase estacionaria está limitado (pH: 3-7 para las columnas convencionales de HPLC), los cambios en la retención solo se observan para algunos compuestos. Por esta razón, los gráficos de retención de compuestos con comportamiento ácido-base generalmente muestran una protonación parcial (**102**).

I.5.2. En gradiente

En este caso, la composición de la fase móvil cambia durante la separación. Generalmente se utilizan fases móviles binarias (solvente A y B), incrementándose el porcentaje del disolvente menos polar durante la separación. Hasta hace relativamente poco tiempo, era considerada una técnica de investigación, excepto para aplicaciones especiales donde los compuestos a separar con elución isocrática presentaban un amplio intervalo de retención (**100-103**).

Algunas razones para trabajar en isocrático son:

- 1) Falta de infraestructura en algunos laboratorios para realizar gradientes.
- 2) El gradiente es más complicado, con lo cual el desarrollo y aplicación de métodos resulta más difícil.
- 3) El gradiente no es compatible con algunos detectores acoplados al HPLC (e.g. índice de refracción).
- 4) El gradiente está relacionado con tiempos de análisis elevados (se requieren tiempos adicionales de reequilibración de la columna después de cada separación).
- 5) La elución en gradiente plantea frecuentemente problemas con la línea base.
- 6) La elución en gradiente es menos precisa, comparada con la isocrática (**102,103**).

Sin embargo, con los recientes avances en la instrumentación y mejor conocimiento de la técnica, muchos laboratorios rutinarios han implantado la elución en gradiente.

Se recomienda la aplicación de la separación en gradiente en los siguientes casos:

- a) Cuando la muestra tenga un amplio rango de retención (bajo condiciones isocráticas los picos con $k > 20$ exhiben colas posteriores). Otra razón para usar el gradiente es que mejora la resolución de los picos

iniciales y genera picos estrechos y simétricos al final del cromatograma (mejora los picos cromatográficos anchos y con cola) (104,79).

b) Para muestras compuestas por moléculas de peso molecular alto. La retención isocrática de este tipo de muestras es muy sensible a cambios pequeños en la composición de la fase móvil, haciendo difícil el control de la retención con límites aceptables. Las muestras de este tipo (péptidos, proteínas, polímeros sintéticos) se separan mejor utilizando una elución en gradiente (79).

c) Algunas muestras se separan bien bajo condiciones isocráticas ($0.5 < k < 20$ para los picos de interés) pero tienen interferencias con tiempos de elución grandes que pueden saturar la columna o aparecer en subsiguientes cromatogramas (“ghost peaks”). La elución en gradiente puede resolver este problema mediante la elución rápida de estas interferencias antes de la próxima inyección (79).

d) La inyección, bajo condiciones isocráticas, de grandes volúmenes de muestra (1-10 mL) causa ensanchamiento de los picos debido a la mezcla de la muestra con la fase móvil durante la inyección. La elución en gradiente permite la inyección de estos volúmenes sin observarse ensanchamiento de picos (79).

Al desarrollar un *método de separación en gradiente*, para una muestra cuya composición es desconocida, existen muchas ventajas al usar inicialmente un gradiente, aunque finalmente el método se realice bajo condiciones isocráticas (79).

- La utilización de un gradiente inicial puede servir para estimar el rango de retención de una muestra, permitiendo la elección de las condiciones isocráticas o de gradiente para los siguientes experimentos.
- Si las condiciones isocráticas son la mejor opción, el gradiente inicial permite estimar el porcentaje del modificador orgánico que proporcione valores de k adecuados ($1 < k < 20$). Si se elige el gradiente, el gradiente inicial permite estimar la mejor concentración inicial y final del modificador orgánico para el próximo gradiente.
- Un gradiente inicial puede servir para obtener una rápida y mejor separación de la muestra que usando condiciones isocráticas. También es más fácil detectar compuestos (de la muestra) a baja concentración que eluyen al inicio o al final del cromatograma.

1.5.2.1. Principios de la separación

En la elución en gradiente, la composición de la fase móvil que rodea a un pico cambia constantemente durante su elución e igualmente lo hace el valor de k para dicho pico. En un cromatograma isocrático usualmente los picos tienen diferente valor de k mientras que en la elución en gradiente lineal el valor efectivo de k (k^*) para diferentes picos es más o menos el mismo. Los valores de k^* en la elución en gradiente pueden calcularse con la **Ec. 5**.

$$k^* = \frac{87t_G F}{V_m (\Delta\%B)S}$$

Ec. 5

$$k^* = \frac{20t_G F}{V_m (\Delta\%B)}$$

Ec. 6

donde t_G es el tiempo de gradiente (min), F el flujo (mL/min), V_m el volumen muerto (mL), $\Delta\%B$ el aumento

del %B y S una propiedad del compuesto. Para muestras de peso molecular entre 100 y 500 Da, $S \approx 4$, y la **Ec. 5** se convierte en la **Ec. 6 (100)**.

El efecto de la pendiente del gradiente en k^* se minimiza al utilizar un parámetro corregido de la pendiente del gradiente (G_s) definida por la **Ec. 7**. Para gradientes de pendientes moderadas el %B/min se define como $\%B/\min = (\Delta\%B)/t_G$. Sustituyendo el término $\Delta\%B$ en la **Ec. 6**, esta se puede describir en la **Ec. 8**.

$$G_s = \frac{V_m (\Delta\%B)}{F t_G} \quad \text{Ec. 7}$$

$$k^* \approx \frac{20}{G_s} \approx \frac{20F}{V_m (\% / \min)} \quad \text{Ec. 8}$$

I.5.2.2. Optimización de la separación

Para obtener buenos resultados se deben seguir 5 pasos (**79**):

- 1.- Determinar la composición inicial y final del disolvente.
- 2.- Ajustar el tiempo del gradiente.
- 3.- Determinar la forma del gradiente (lineal, segmentado, cóncavo o convexo).
- 4.- Ajustar la velocidad del flujo para mejorar la resolución.
- 5.- Regresar a las condiciones iniciales.

a) Influencia de la pendiente. Debido a la similitud entre la elución isocrática y en gradiente, valores altos de k^* deberían de causar los mismos efectos que valores altos de k : 1) Al inicio, un incremento de la resolución (R_s) al incrementar la k^* , después R_s disminuye. 2) la disminución de la altura de pico implica su ensanchamiento y 3) Tiempos de análisis más largos.

Los efectos en elución isocrática y en gradiente son:

- El incremento de %B/min en gradiente es análogo al incremento de %B en isocrático.
- Un incremento de k^* en gradiente (**Ec. 8**) es análogo al incremento de k en isocrático.

b) Influencia del rango. Se refiere a la diferencia entre el porcentaje inicial y final del disolvente orgánico (%B) del gradiente. Un experimento exploratorio inicial puede ser un gradiente de rango amplio (e.g. 5 a 100%B). Para algunas columnas (e.g. C_8 y C_{18}) es recomendable que el %B inicial sea mayor a 5% para evitar daños a la fase estacionaria (**79**).

c) Influencia de la forma. La mayoría de las separaciones en gradiente involucran gradientes lineales, ya que éstos deben ser usados en las etapas preliminares del desarrollo del método y son más fáciles de optimizar. En algunos casos, con un gradiente lineal segmentado (dos o más gradientes lineales) se consigue reducir el tiempo de análisis y/o aumentar la resolución. Sin embargo en algunos casos los gradientes no-lineales pueden mejorar la separación (**105**).

La optimización de la forma del gradiente puede requerir muchos experimentos y la ventaja de un gradiente no-lineal es generalmente poco rentable. El uso de gradientes no-lineales tiene más sentido cuando se dispone de una simulación computacional (**105**).

I.5.2.2.1. Ajuste de la selectividad

El cambio de selectividad utilizando gradientes puede conseguirse de la misma forma que en elución isocrática. Por ejemplo, con el cambio de k^* mediante el cambio de pendiente del gradiente (104), tipo de modificador orgánico, tipo de columna, pH, etc. En la separación en gradiente de muestras neutras, la prioridad de las variables a optimizar se puede establecer como sigue: fuerza de la fase móvil, tipo de disolvente (ACN > MeOH > THF), tipo de columna (C_8 y C_{18} > ciano > fenil) y finalmente, temperatura. En caso de que la muestra contenga compuestos iónicos, la temperatura y el pH son variables importantes en el ajuste de la selectividad.

Una vez establecido el % inicial y final de modificador, para reducir el tiempo de análisis o mejorar la resolución es necesario ajustar la selectividad, estudiando (79):

a) Pendiente. La variación del porcentaje del modificador orgánico (%B) en una separación isocrática causa cambio de k y α . Se puede lograr un cambio equivalente en la elución en gradiente mediante la variación de su pendiente. En la elución en isocrático, el rango de k de la muestra solo puede ser variado (variando el %B) en un factor de 8, mientras que en la elución en gradiente el rango de k^* de la muestra puede ser variado (variando la pendiente del gradiente) en un factor de 40. Más aún, con el uso de gradientes segmentados, k^* se puede optimizar para diferentes partes del cromatograma y de esta forma se maximiza la selectividad y resolución global.

b) Tipo de disolvente (modificador orgánico). Siempre es útil un cambio de disolvente (MeOH, ACN, THF o mezclas de estos) para cambiar la selectividad y mejorar la resolución, especialmente para muestras de compuestos neutros.

c) Otras variables. En elución en gradiente, principalmente para muestras iónicas, la selectividad es afectada en gran medida por los valores de pH, temperatura, uso de disoluciones micelares. El uso de disoluciones reguladoras y micelas en la elución en gradiente (a porcentajes altos de modificador orgánico) requiere mucha atención debido a la baja solubilidad de algunas disoluciones reguladoras y micelares.

I.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

I.6.1. Toma y conservación de muestra

El pienso debe recogerse en un recipiente limpio, seco y con tapa hermética, utilizando instrumentos limpios para evitar contaminación externa. Las muestras deben almacenarse en un lugar seco (10-25 °C), para su posterior análisis en un tiempo no mayor a dos semanas (79,106).

I.6.2. Preparación de muestra

La mayoría de los análisis de drogas en muestras de pienso requieren procedimientos de tratamiento de muestra con el fin de mejorar las condiciones analíticas y permitir una identificación o cuantificación más garantizable (e.g. eliminación de proteínas, pigmentos, ácidos grasos, etc.). Estos pueden incluir etapas tales como (106):

- *lixiviación*
- *extracción líquido-líquido o en fase sólida*
- *hidrólisis*
- *saponificación*
- *derivatización*
- *preconcentración*

a) Lixiviación

Es un proceso que consiste en disolver selectivamente los componentes mayoritarios o los elementos traza deseados de una muestra en un disolvente apropiado. El procedimiento varía según se deseen disolver los macro-componentes o elementos traza. En general, para realizar esta separación es necesario que los constituyentes que se desean disolver estén en contacto directo con el disolvente **(106)**.

b) Extracción líquido-líquido (ELL)

Esta técnica de separación está basada en la diferente distribución de los analitos entre dos fases líquidas inmiscibles (generalmente orgánica y acuosa), como consecuencia de sus solubilidades relativas **(107,108)**.

En un proceso general se suelen seguir diferentes etapas:

- Preparación previa de la muestra si ésta no es una disolución. Si fuera necesario, se deben preparar derivados de los solutos o llevar a cabo modificaciones químicas de la disolución (formación de complejos o ajustes de pH) para maximizar las diferencias de solubilidad entre las fases.
- Añadir un disolvente insoluble al que contiene la muestra para obtener dos fases.
- Agitar la mezcla hasta que la partición de los solutos entre las dos fases alcance el equilibrio.
- Permitir la separación de las dos fases.
- Recoger aquella que contiene los compuestos de interés.
- Por último si se requiere preconcentrar se puede llevar a sequedad la fase que contiene los analitos y reconstituir el residuo con un volumen adecuado de disolvente.

Estas etapas posibilitan la presencia y preconcentración de los compuestos de interés en un disolvente adecuado (aumento de la sensibilidad) y, la separación de otros compuestos interferentes (aumento de la selectividad). Otra ventaja que proporciona la ELL, es su amplia selectividad debida al elevado número de disolventes disponibles, siendo primordial su elección con el objetivo de separar los solutos de compuestos interferentes. Otro aspecto importante es el pH de la fase acuosa, ya que en muchos casos de éste depende que el analito a separar esté en forma adecuada para su transferencia a la fase orgánica. Generalmente, el valor del pH se ajusta a un valor tal que el analito no se disocie (e.g. pH ácido). Así, una gran parte de los compuestos de la matriz pueden estar ionizados y, por tanto, no extraerse, eliminándose posibles interferencias **(109)**. Para optimizar un procedimiento de ELL es necesario estudiar otras variables que influyen en el proceso tales como: tiempo de agitación, relación de extracción, adición de agentes salinos ("salting-out"), que disminuyen la actividad del agua y favorecen la solvatación.

La ley de distribución de Nerst establece que cualquier especie se va a distribuir en dos fases inmiscibles de manera que la relación de concentraciones diluidas sea constante: $K_D = C_o/C_{aq}$, donde K_D es la constante de distribución, C_o es la concentración del analito en la fase orgánica y C_{aq} es la concentración del analito en la fase acuosa. De esta expresión se deriva otra más útil, que define la fracción de analito extraído (E) en la fase orgánica:

$$E = \frac{C_o V_o}{C_o V_o + C_{aq} V_{aq}} = \frac{K_D V}{1 + K_D V}$$

donde V_o es el volumen de la fase orgánica, V_{aq} es el volumen de la fase acuosa y V es la relación de fases o de extracción (V_o / V_{aq}).

La mayor desventaja de la ELL es la formación de emulsiones, causando pérdidas de compuestos por oclusión, y conduciendo a rendimientos de extracción bajos y variables. La formación de emulsiones se puede evitar calentando o enfriando las fases, añadiendo sales, detergentes o ácidos fuertes, usando métodos de agitación menos vigorosos o usando un volumen mayor de disolvente extractante relativo al de la fase acuosa (107,110).

c) Extracción en fase sólida (EFS)

En este caso se hace pasar la matriz que contiene los analitos de interés por un material sorbente, quedando éstos retenidos y posteriormente eluidos con un disolvente adecuado. El gran auge de la EFS, surgió de la idea de utilizar rellenos similares a los que utilizan las columnas de HPLC ("cartuchos"). Comercialmente se suministran en envases de plástico rellenos de diferentes materiales y cantidades variables para cada tipo de material (107,111). Estos cartuchos son desechables y vienen herméticamente sellados en paquetes con objeto de evitar contaminaciones y alteraciones de su superficie (112). El éxito de esta técnica depende de la afinidad relativa de los analitos por el sorbente y la posterior facilidad para eluirlos. Se han utilizado materiales tales como carbono; celita; sílica químicamente ligada a grupos tales como C_2 , C_8 , C_{12} , C_{18} , C_{20} , etc; florisil (silicato magnésico activado) y alúmina (óxido de aluminio), obteniéndose éxitos variables. También se han utilizado resinas no iónicas tales como estireno-divinilbenceno que no se contrae o expande por hidratación (107,113). También se han desarrollado sorbentes poliméricos de estructura hidrofóbica y diferente tamaño de partícula, área superficial y grado de entrecruzamiento (e.g. Nexus, Strata X, LiChrolut EN etc.). Los sorbentes poliméricos en comparación con los de base sílica tienen mayor capacidad para analitos polares esto podría atribuirse a un mayor contenido de carbono y especialmente a la elevada área superficial (114). En la **Tabla 6** se muestran algunos ejemplos de cartuchos comerciales y aplicaciones (79).

En general, las interacciones analito-sorbente se pueden clasificar en 5 tipos (115):

- *No polares.* Tienen lugar entre los enlaces C-H de los grupos funcionales del sorbente y los enlaces C-H del analito. Las fases no polares más comerciales son las C_{18} (octadecilo), C_8 (octilo), C_2 (etilo), CH (ciclohexilo) y PH (fenilo).

- **Polares.** Incluyen enlaces por puentes de hidrógeno, dipolo/dipolo, dipolo/dipolo inducido, enlaces π , y una gran variedad de interacciones en las cuales la distribución electrónica entre átomos individuales es desigual (provocando polaridades positivas y negativas). Los grupos funcionales que presentan interacciones polares son: hidroxilo, carbonilo, anillos aromáticos, sulfidrilo, dobles enlaces y grupos que contienen heteroátomos como oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Las fases polares más comerciales son las CN (Cianopropilo), 2OH (diol), SiOH (sílica no enlazada) y -NH₂ (aminopropilo).
- **Iónicas.** Tienen lugar entre una molécula de analito cargada y una fase sorbente con una carga opuesta a la que posee el analito. Se pueden subdividir en catiónicas (analito cargado positivamente) y aniónicas (analito cargado negativamente). Las fases de intercambio iónico más comerciales son las PSA (N-propiletildiamina), DEA (dietilaminopropilo), SAX (trimetilaminopropilo), CBA (carboximetilo) y PRS (sulfonilpropilo).
- **Covalentes.** Son el resultado de la formación de enlaces covalentes entre la fase sorbente y el analito.
- **Múltiples.** Se produce cuando tienen lugar simultáneamente varias de las interacciones anteriores en los procesos de elución y retención.

Tabla 6. Rellenos de cartuchos de EFS y condiciones de trabajo (P= polaridad).

Separación	Rellenos	Estructura (s)	Analito	Muestra	Elución
Fase normal					
Adsorción	Sílica, Alumina, Florisil	SiOH, AlOH, Mg ₂ SiO ₃	P Escasa/moderada	P baja	P alta
Polar	Cianopropilo, Aminopropilo, Diol	CN, NH ₂ , CH(OH)-CH(OH)	P Moderada/fuerte	P baja	P alta
Fase reversa					
Apolar	Octadecilo Octilo	(CH ₂) ₁₇ -CH ₃ (CH ₂) ₇ -CH ₃	Muy polar	P alta	P baja
Intermedia	Ciclohexil, fenil	Anillos aromáticos	P moderada	P alta	P baja
Polar	Butil Etil Metil	(CH ₂) ₃ -CH ₃ CH ₂ -CH ₃ CH ₃	P Escasa/moderada	P alta	P alta
Int. Aniónico					
Débil	Amina 1° Amina 2°	(CH ₂) ₃ -NH ₂ (CH ₂) ₃ -NH-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	Iónico-ácido	pH=pKa +2	Alta fuerza iónica
Fuerte	Amina cuaternaria	(CH ₂) ₃ -N ⁺ (CH ₃) ₃	Iónico-ácido	pH=pKa +2	Alta fuerza iónica
Int. Catiónico					
Débil	Ácido carboxílico	(CH ₂) ₃ -COOH	Iónico-básico	pH=pKa -2	Alta fuerza iónica
Fuerte	Ácido sulfónico alquil Ácido sulfónico aromático	(CH ₂) ₃ -SO ₃ H	Iónico- básico	pH=pKa -2	Alta fuerza iónica

En general, la separación de los solutos está basada en los mismos principios de la técnica de HPLC. Algunas consideraciones importantes a la hora de seleccionar un cartucho son:

- Buscar en la bibliografía métodos para compuestos similares.
- Considerar las propiedades físico-químicas de los analitos.

- Considerar las propiedades físico-químicas de la matriz a tratar.
- Evaluar la retención de los analitos en varios tipos de cartuchos.
- Evaluar los efectos del cambio de pH.
- Comparar los rendimientos obtenidos para los analitos disueltos en agua y en la matriz de interés.

Las diferencias son debidas a interferencias causadas por compuestos presentes en la matriz (efecto matriz).

- La elución debe ocurrir eficientemente.
- Optimizar la cantidad de sorbente.

Entre las ventajas de la EFS destacan: la mínima introducción de impurezas en el sistema cromatográfico, eliminación total de emulsiones, el escaso tiempo empleado y la posibilidad de acoplarse "on-line" con el sistema cromatográfico. La mayor desventaja que presenta es la elución con disolventes.

Debido a que la mayoría de los materiales son sílicas ligadas es de esperar que sean estables en un intervalo de pH limitado. Sin embargo, se ha comprobado que debido al escaso tiempo de residencia disolución-sorbente, en la práctica los intervalos de pH son superiores.

d) Hidrólisis

La hidrólisis es una reacción del agua con una sustancia. Se define como la descomposición de compuestos orgánicos e inorgánicos complejos en otros más sencillos por acción del agua. En la reacción química, una molécula de agua reacciona con una molécula de una sustancia AB, en la que A y B representan átomos o grupos de átomos. En la reacción, la molécula de agua se descompone en los fragmentos H^+ y OH^- , y la molécula AB se descompone en A^+ y B^- . A continuación, estos fragmentos se unen proporcionando los productos finales AOH y HB. Normalmente se utiliza la hidrólisis en un medio de pH controlado en combinación con la ELL o EFS para evitar la extracción o retención de interferencias de la matriz.

e) Saponificación

La saponificación (siempre en medio básico) es una reacción química entre un lípido saponificable (ácido graso) y una base, obteniéndose como principal producto la sal de dicho ácido y un alcohol. Estos compuestos tienen la particularidad de ser anfipáticos, es decir tienen una parte polar y otra apolar, con lo cual pueden interactuar con diferentes sustancias. Por ejemplo, los jabones se obtienen mediante saponificación (**Fig. 15**).

Un *lípido saponificable* sería todo aquel que esté compuesto por un alcohol unido a uno o varios ácidos grasos. Esta unión se realiza mediante un enlace ester muy difícil de hidrolizar. Sin embargo, éste puede romperse fácilmente en medio básico, produciéndose la saponificación. Esta reacción se puede utilizar para eliminar interferencias causadas por los aceites de la muestra mediante su precipitación como jabón (no sujeto a la ELL).



Fig. 15. Reacción de saponificación.

f) Derivatización

La derivatización tiene aplicación en un intervalo amplio de disciplinas. Los métodos de derivatización, además de las áreas tradicionales como química orgánica y bioquímica, son parte integral de muchos análisis químicos practicados en disciplinas médicas, forenses y medioambientales. En general, el uso de la derivatización se ha empleado por dos razones: 1) para permitir el análisis de compuestos no susceptibles al análisis (e.g. inadecuada volatilidad o estabilidad) y 2) para mejorar el análisis (e.g. comportamiento cromatográfico o mejorar la sensibilidad). Bajo este concepto, las razones específicas para aplicar una derivatización difieren con la técnica analítica a usar (116).

La razón más importante para derivatizar en GC es conseguir un aumento de volatilidad para compuestos no volátiles. La volatilidad baja de un compuesto se puede deber al tamaño grande de la molécula y, por tanto, con fuerzas de dispersión grandes. En moléculas pequeñas la baja volatilidad resulta de atracciones intermoleculares fuertes debidas a grupos polares (N-H, O-H, S-H, C=O). En este sentido, la sustitución de hidrógenos activos con grupos trimetilsilil genera productos muy volátiles (117,118).

Los esteroides son compuestos poco volátiles debido a que contienen grupos polares (hidroxilos, cetónicos). Por esta razón, en el análisis mediante CG-MS se recurre a reactivos derivatizantes (Fig. 16). Al derivatizar se puede mejorar su estabilidad térmica, volatilidad, selectividad, sensibilidad, además de prevenir una posible adsorción irreversible. Al modificar la estructura se modifica el patrón de fragmentación en GC-MS, siendo mayores las diferencias entre fragmentaciones, consiguiéndose mayor poder separativo (117,119).

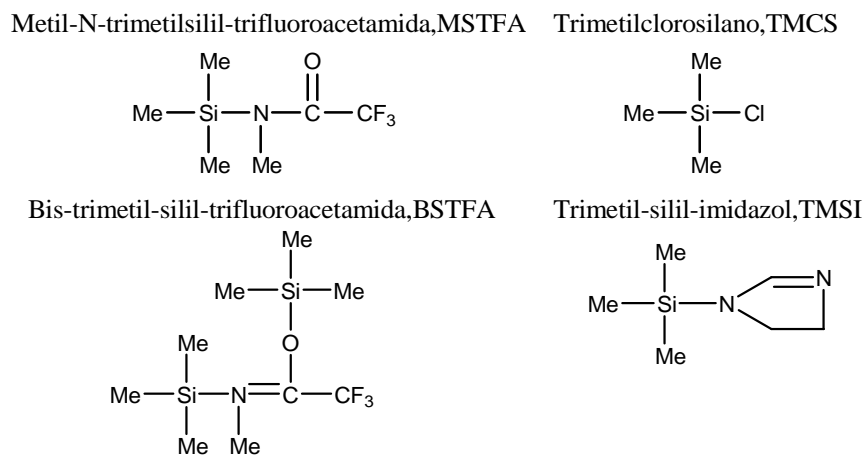
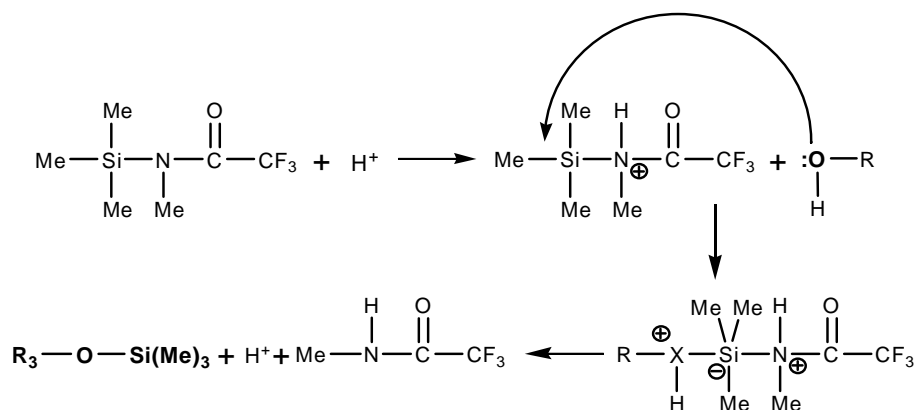


Fig. 16. Reactivos derivatizantes más utilizados para el análisis de esteroides.

La trimetilsililación es una reacción de derivatización (Fig. 17) muy utilizada, que implica a los grupos hidroxilo y carbonilo de estos compuestos, formando como derivados el correspondiente trimetilsililéter o la metiloxima-trimetilsililéter (120-122).

a)



b)

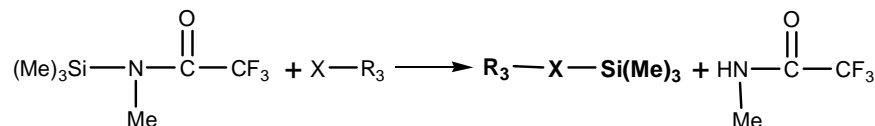


Fig. 17. a) Mecanismo general de la reacción de silanización, b) Reacción general de derivatización, donde X es un oxígeno (grupo hidroxilo o cetónico) y R el resto de la molécula.

g) Preconcentración

Implica una disminución de volumen. Este proceso se utiliza para aumentar la concentración de los analitos y, por tanto, su capacidad de detección. Sin embargo, tiene el inconveniente de aumentar también la concentración de las interferencias de la muestra. Todo ello indica que el proceso será viable si previamente se ha realizado una purificación conveniente.

I.7. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación de un método es el proceso utilizado para “comprobar” que el procedimiento analítico empleado es apropiado para el uso que se pretende (123). Los métodos necesitan ser validados o revalidados:

- antes de aplicarlos en análisis de rutina,
- siempre que cambien las condiciones de análisis del método, y
- siempre que el método cambie, y el cambio quede fuera del campo de aplicación del método original.

Los métodos analíticos deben validarse, es decir, definir ciertos parámetros de forma que cualquier analista pueda interpretarlos correctamente. Los parámetros de funcionalidad de un método comprenden todas las características experimentales evaluadas estadísticamente y que demuestran su aptitud para el uso al que se destina. Dichas características son:

- De fiabilidad: Demuestran la capacidad de un método para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.
- De practicabilidad: Deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica.
- De idoneidad: Conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde a los requisitos fijados en la validación del método.

I.7.1. Necesidad y entorno legal

A menudo cuando se plantea realizar la validación de un método analítico, se piensa en los problemas de tiempo y material que supone realizar su estudio detallado, olvidando las ventajas que representa **(124)**. En este sentido, la validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza, seguridad en el método analítico, calidad de los resultados y permite el conocimiento de sus características de funcionamiento. Este conocimiento y seguridad del método analítico se traduce en la disminución del número de fallos y repeticiones, en el cumplimiento de los plazos de análisis previstos y en la optimización del método, por ejemplo, mejorando la característica de practicabilidad y posibilidad de automatización.

Por otra parte, los métodos analíticos deben validarse para dar cumplimiento a exigencias legales.

- La Comisión Reguladora de la Unión Europea (CRUE) ha elaborado un borrador de Directiva Comunitaria para la Validación de Métodos Analíticos. Dicho documento constituye una nota explicativa para el cálculo, interpretación y presentación de los datos de validación de métodos analíticos.
- La Food Drug Administration requiere que los métodos sean validados y debidamente documentados.
- Las Good Manufacturing Practice de los EEUU indican que deben establecerse y documentarse la exactitud, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados.

Los métodos analíticos son usados para muchos propósitos, y los diferentes métodos de análisis requieren diferentes tipos de validación. La CRUE ha establecido las características de funcionamiento a evaluar para los métodos analíticos destinados a la detección de esteroides en cualquier tipo de matriz. Dicha guía se muestra en el Anexo I **(18)**.

CAPÍTULO II

Antecedentes bibliográficos

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las abreviaturas empleadas en las **Tablas 7 y 8** se encuentran descritas en un glosario (pag. 1)

II.1. En cromatografía de líquidos (HPLC)

En la **Tabla 7**, se muestran las referencias bibliográficas encontradas sobre la determinación de esteroides por HPLC. Se incluyen en ésta las condiciones cromatográficas más significativas: fase móvil y estacionaria, analitos implicados, así como aspectos relacionados con la preparación de muestra. Como se observa, las columnas más empleadas son las de partículas y en concreto las C₁₈, además el modificador orgánico y detector más utilizados son ACN y UV. Actualmente se ha incrementado la utilización de detectores MS por razones de confirmación. Por otro lado, destaca el estudio de esteroides de diferente naturaleza, con tendencia a la resolución de mezclas sencillas.

Tabla 7. Resumen de antecedentes en HPLC.

Condiciones cromatográficas		Detec.	L.D.	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
						ELL	EFS		
MeOH:H ₂ O (60:40)	Hypersil ODS (150 x 4.6 mm x 5 μm)	UV		O	17β-TB, NT, Z, DES, MT MedroxiPG	DEE			125
Isoctano:EtOH Gradiente	Chrompak Hypersil (150 x 4.6 mm x 5 μm) Fase normal	UV	0.3 ng	O	17α-TB 17β-TB Triendiona	DEE			126
Isoctano:EtOH Gradiente	Lichrosorb Diol (150 x 4.6 mm x 5 μm) Fase normal	UV		Pa	MT, T, NT, TB, PG, MedroxiPG, EST, Meso-hexestrol, Z, EEST, DES, Dienestrol				127
MeOH:H ₂ O Isoctano:EtOH Gradiente	Hypersil ODS (150 x 4.6 mm x 5 μm) Lichrosorb Diol (150 x 4.6 mm x 10 μm)	Q		O	MT, NT, T, TB, Z, DES, Dienestrol hexestrol MedroxiPG	DEE			128
EtOH: H ₂ O (95:5)	Chrompak Lichrosorb 5RP18 (150 x 4.6 mm)	UV		Pa	NT, EST, EEST, PG, CL				129
ACN:H ₂ O:MeOH (6:4:1)	Lichrosorb RP18 10 μm	UV		Pa	5α-androst-2-en-17-ona				130
MeOH:H ₂ O (65:35)	Hypersil ODS (150 x 4.6 mm)	UV RIA	O 0.1ppt B 0.5ppt	O B	17β-NT 17α-NT		IAC EtOH:H ₂ O 40:60		131
Gradiente MeOH:H ₂ O ACN: H ₂ O (82:18) ACN:THF: H ₂ O (41:29:30)	Nova Pak C ₁₈ (150 x 4.6 mm x 5 μm)	UV		Pa	Varios esteroides				132
ACN:H ₂ O (35:65)	Chromsphere (100 x 3 mm x 5 μm)	UV	C 50 ppt H y R 1 ppb	C, H, R, O, B,	NT, TB		Amberlita XAD-2	O 83 B 85 C 51	133
MeOH:H ₂ O (60:40)	Hypersil ODS (150 x 4.6 mm x 5 μm)	UV DAD		Pa	NT, TB, MT, EST, Z, MedroxiPG				134
MeOH:Ac(20mM) (pH=7.2) (65:35)		UV		O	NT y met, EST, Benzoato	MeOH	SiOH		135

Condiciones cromatográficas		Detec.	L.D.	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
						ELL	EFS		
MeOH:Ac ⁺ (20mM) (65:35) ACN:Ac ⁺ (20mM) (42:58)	RP18 Ultrasphere ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	1 ppb	O, G de R	NT, NOA	MeOH	SiOH	72± 8	136
(Sin conjugar) ACN:H ₂ O (90:10) (Conjugados) H ₂ O:H ₃ PO ₄ Gradiente	RP18 Nucleosil (250 x 10 mm x 7 µm)	UV		O	ES y met		XAD-2 DEE		137
MeOH:H ₂ O Gradiente	Zorbax ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	MS, UV, IR		A, Ta, S	Varios Ester, T, NT	MeOH:H ₂ O 75:25		60-100	138
MeOH:H ₂ O (75:25)	Hypersil C ₈ (150 x 4.6 mm x 5 µm) Nucleosil C ₁₈ (150 x 4.6 mm x 5 µm)	F	1-5 ppb	M	MT y met	H ₂ O:CHCl ₃ : MeOH CHCl ₃	Lipidex 5000 Sep Pak SiOH	91-94	139
A= MeOH:H ₂ O B= ACN Gradiente	Zorbax ODS (250 x 4.0 mm x 5 µm)	UV		O	TB y met		XAD-2 Al ₂ O ₃	>85	140
ACN:H ₂ O (45:55)	Ultrasphere ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV		Célul Canc	T, EST, DHEA, ANDOA	DEE		86-94	141
ACN:H ₂ O Gradiente	C ₁₈ (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV		H, Me	T, TB, PG, Estrógenos		Carbopak B CG400I	92	142
ACN:H ₂ O (35:65)	Lichrosorb C ₁₈ (100 x 3 mm x 5 µm)			Pa	NT, NE, NG			>97	143
ACN:H ₂ O Gradiente	ODS-2 (250 x 4.0 mm x 5 µm)	UV		O	T		RP18 -NH ₂	82	144
A= H ₂ O:THF B= MeOH:THF Gradiente	Supelcosil LC-18 DB (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV		P	T y met	DCM	Chem Elut	90 ± 3	145
ACN:H ₂ O (50:50)	NovaPak C ₁₈ (100 x 8.0 mm x 4 µm)	UV		O, P	DHEA, E-T, T	DCM DEE	C ₁₈		146
MeOH:H ₂ O (70:30)	Brownlee RP8 Spheri 5 (100 x 4.6 mm)	EQ	~pmol	O, P	T, AND		C ₁₈	97	147
A= ACN:MeOH:THF (45:15:5) B= H ₂ O:HAc (99.8:0.2) Gradiente	SFCC ODS 1 (250 x 4.6 mm x 5 µm)	RIA		H, Carc.	MT		TLC Lipidex 5000 XAD-2		148
H ₂ O:MeOH (35:65)	NovaPak C ₁₈ (150 x 3.9 mm x 4 µm)	UV		O	NT y met		C ₁₈ -NH ₂	C ₁₈ 97 -NH ₂ 92	149
A = ACN B = H ₂ O:ACN (95:5) Gradiente	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	1 ppb	O	ANDOA	DEE		>70	150
MeOH:H ₂ O Gradiente	C ₁₈ Ultrasphere ODS (80Å) (250 x 10 mm)	UV		T	DES, Z, TB, EEST, NT, MeB, EST, T, MT	DEE	SiOH C ₁₈		151
2,2,4-TMP:PrOH (80:15)	Spherisorb: S5CN y S5W (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	0.1-0.3 ppb	H	TB, NT	ACN MeOH DCM		TB 59 NT 39	152
ACN:AcNH ₄ (0.1M) (45:55)	Lichrosorb RP-18 (125 x 4 mm)	MS	0.5 ppb	B Hec	TB-A	Hec TBME B DEE	Bond Elut CN IAC	62-75	153
THF:H ₂ O (72:28)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	0.02- 0.14 ng	O	Varios CC	DCM			154
ACN:H ₂ O (32:68 y 40:60)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm.)	UV		O	CC naturales y sintéticos	DCM	Extra-Sep C ₁₈ Serdolit AD-2	>90	155
MeOH:H ₂ O (90:10)	Ultrasphere C ₁₈ (100 x 4.6 mm)	UV		P	Ésteres de T y NT		SPE automática	115	156

Condiciones cromatográficas		Detec.	L.D.	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
						ELL	EFS		
ACN:H ₂ O (50:50)	(250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV		O			C ₁₈		157
MeOH:H ₂ O (65:35)	Zorbax ODS (250 x 4.6 mm x 5 μm)			Ta, In	T, E-T, FM, MT, T cipationato				158
MeOH:H ₂ O:THF (35:55:10)	(250 x 4.6 mm x 5μm.)	UV		H	T y 9 met			>94	159
ACN:H ₂ O Gradiente		MS		T	CLO, HidroxiPG, DHEA,	DCM		80-91	160
MeOH:ACN: NaH ₂ PO ₄ (15:80:5) Gradiente	Nova-Pak C ₁₈ (150 x 3.9 mm x 5 μm.)	UV	1 ppm	S	BM, DM, Otros CC	DEE		>85	161
0.1 M SDS:PeOH (7:93)	Spherisorb C ₁₈ (12 x 4.6 mm x 5 μm)	UV		Me	14 EAA	SDS		>90	162
MeOH:H ₂ O (58:42) ACN:H ₂ O (30:70) THF:H ₂ O (25:75)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV	0.5 ng	O	CL, CS	DCM		>94	163
75-200 mM SDS:ACN Gradiente	Spherisorb ODS (120 x 4.6 mm x 5 μm)	UV		Pa	B, DMT, MT, ES, Dihidro-PG, Medroxi-PG, Medroxi-PG-A, NT, PG, T, T Prop.				164
ACN:H ₂ O (30:70) Hex:PrOH (90:10) ACN:H ₂ O (95:5)	Chiralpak AD (250 x 4.6 mm x 10 μm) Nucleodex β y γ-PM (200 x 4.0 mm x 5 μm)	UV		Pa	 Etinodiol, Etinodiol-17-A, NT, NT-A, Norgestrel, EtilNT				165
MeOH:H ₂ O (60:40)	Hypersil ODS (100 x 4.6 mm x 5 μm)	UV	0.20 - 0.25 ppm	Pil, In	DES, Hexestrol, Dienestrol, DM	DEE	Sephadex LH 20		166
ACN:H ₂ O Gradiente	Hypersil ODS (250 x 3.2 mm x 5 μm)	UV		P, Sa	T, CL		Kieselguhr		167
ACN:AcNH ₄ (45:55)	Ultrasphere ODS (250 x 2.1 mm x 5 μm)	MS		O	B, BLS, TB, MET, MT, T		Bond Elut C ₂	≈ 80	168
H ₂ O:MeOH Gradiente	Zorbax C8 (4.5 x 25.0 x 2 μm)	RIA		S, P	T, ANDOA, DHEA	ACN		88-91	169
MeOH:THF:H ₂ O (3:25:72)	Spherex (250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV		S, O	CL, DeoxiCL, PL, MPL, DM		Sep-pak C ₁₈		170
MeOH:THF:H ₂ O (25.5:9:65.5) MeOH:ACN:H ₂ O (4:22:74)	Prontosil C ₁₈ (250 x 4.0 mm x 5 μm)	UV		Pa	Varios esteroides BM, DM				171
Ac NH ₄ :ACN (60:40)	Spherisorb ODS2 (250 x 4.6 mm x 5μm.)	MSn	50 ppt	O	BM, DM, Otros CC sintéticos		Varian C ₁₈	85	172
A=HAc (0.11%) + AcNH ₄ B= MeOH:ACN Gradiente	Hypersil C ₁₈ BDS (250 x 3.0 mm x 3 μm)	MSn	E-T 25 pg T 3 pg	O	E-T, AND, T, DHEA				173
ACN:H ₂ O-AcNH ₄ (35:65)	Lichrocart (150 x 4.0 mm x 4 μm)	MS		Pa	PL, PS, CL, CS,		C ₁₈		174
MeOH:H ₂ O (5:95)	C ₁₈ (250 x 10 mm x 40 μm)	MS		O	FM	DCM:PrOH (9:1)	Bond Elut C ₁₈		175
ACN:AcNH ₄ (70:30)	Betasil C ₁₈ (100 x 1.0 mm x 5μm)	MSn		O	T, E-T		Distintos cartuchos		176
ACN:H ₃ PO ₄	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 μm.)	UV	0.06-0.09 ng	Me	BM, BM Val, DM, DMFos, Otros CC.			>90	177

Condiciones cromatográficas		Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
						ELL	EFS		
ACN:H ₂ O (76:24 y 73.5:26.5)	Nucleosil C ₁₈ (100 x 3.2 mm x 5 μm)	UV		O	CL, CT, DM.		MF C ₁₈	84	178
A:ACN:MeOH (1:1) B:AcNH ₄ 100mM Gradiente	ODS-AQ (50 x 4.0 mm x 3 μm)	MSn	4-30 ppm	O	CC		Micro-extracción		179
MeOH:H ₂ O:Ac. acético Gradiente	Hypersil C ₁₈ (250 x 1.0 mm x 5 μm)	MS		O	Etanolona y met		C ₁₈ -SAX		180
MeOH:AcH 1% (70:30)	Supelcosil LC-8DB (150 x 4.6 mm x 5 μm.)	MS	2-5 ng	Le	10 CC (BM, DM, Otros)		C ₁₈	>80	181
MeOH:H ₂ O (59:41)	Nucleosil C18 (150 x 4.6 mm, 3 μm)	MS		O	CL		Chem Elut C ₁₈		182
MeOH:H ₂ O Gradiente	Hypersil ODS (150 x 4.6 mm x 5 μm)	MS		O B	NT Laurato		MegaBE C ₁₈		183
PrOH:Hex (7:93)	Econosphere (250 x 4.6 mm x 5 μm)	F		O	Varios CC				184
ACN:H ₂ O (30:70)	Inertsil ODS80A (250 x 4.6 mm x 5 μm.)	UV	0.25-1 ppm	Me	BM, DM, Otros CC		C ₁₈	66-106	185
Hex:PrOH (90:10)	Diol (250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV	0.1 ppb	Pie	Varios CC	DCM/Hex	SiOH-C ₁₈	55	186
36 mM SDS:BuOH (98.09:1.91)	Hypersil ODS (250 x 3.2 mm x 5 μm)	UV	42-74 ng (20μL)	O	CC Naturales y sintéticos	DCM			187
MeOH:H ₂ O + 0.8% AcH (82:18)	Spherisorb ODS (250 x 4.0 mm x 5 μm)	MS	0.03-0.17 ppb	Pe	DM, Otros CC.		C ₁₈	>85	188
MeOH:ACN:H ₂ O (17:46:37)	LC 18 (250 x 4.6 mm x 5 μm.)	UV	10 ppm	Me	Fluocortolona	MeOH		100	189
ACN:H ₂ O Gradiente	Alltima (150 x 2.1 mm x 5 μm.)	UV MS	0,5 ppb	O, Pie	DM,FLU,TRA	TBME	Oasis-HLB -NH ₂	>80	190
ACN:H ₂ O (70:30) 2mM AcNH ₄	Kingsorb C ₁₈ (250 x 2.0 mm x 5 μm)	MS	0.1 ppb	O, S	NT, T, PG		C ₁₈	72-88	191
ACN:FrNH ₄ Gradiente	Monolítica capilar	MS		O	8 EAA		C ₁₈ Resina: QAE Sephadex		192
ACN:Fr pH=3 Gradiente	Ultrasphere OBD (150 x 2.0 mm x 5 μm)	MS	Pe 0.1 ppb	O Pe	9 CC (PL, PS, MPL, CL, BM, DM, TRA, etc)	Pe MeOH	Pe C ₁₈	Pe 71-90	193
ACN:H ₂ O (45:55)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV	12-110 ppb	C,O	14 EAA	Cap MeOH	O DCM	O >90	194
ACN:H ₂ O (40:60)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV	12-110 ppb	O	13 Ester		DCM	>91	195
MeOH:H ₂ O 0.5% Ac. fórmico (80:20)	Luna C ₁₈ (150 x 4.6 mm x 5 μm)	MS	0.2 ppb	S	PG, norgestel	DEE		78-93	196
ACN:AcNH ₄ pH=2 (70:30)	Prontosil C ₁₈ (250 x 4.0 mm x 5 μm)	UV	10 ppb	T, S	TB, TB-A, Z, ES, T, PG	TBME	SiOH	92-108	197
ACN:H ₂ O (55:45)	Lichrosphere 100 RP-18 (125 x 4.0 mm x 5 μm)	UV		Pa	DZ				198
ACN:H ₂ O Gradiente	Lichrospher C ₁₈ (250 x 4.0 mm x 5 μm)	UV		H, O, Le	5 Ester	20mL 0.1 M HCl	Extrelut 20 MIP	>91	199
ACN: MeOH:H ₂ O (35:60:5)	Kingsorb C ₁₈ (250 x 2.0 mm x 5 μm)	MSn		H	BM, DM	EtOH		74-76	200
ACN:H ₂ O (35:65)	ZirChrom-PBD (150 x 4.6 mm x 3 μm)	UV		Pa	T, E-T, ANDOA				201
MeOH:H ₂ O Gradiente	Nucleosil C ₁₈ (50 x 2.0 mm x 5 μm)	MS	3 ppb	Pe, O, Ca	12 CC	DEE MeOH	C ₁₈ SiOH		202

Condiciones cromatográficas		Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
						ELL	EFS		
ACN:H ₂ O (25:75)	Luna (100 x 2.0 mm x 3 µm)	MS	3 ppb	O	DHEA y met		C ₁₈	60-107	203
ACN:H ₂ O Varias	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV		O	15 EAA	DCM	C ₁₈	> 90	204
MeOH:H ₂ O Gradiente	Nucleosil C ₁₈ (50 x 2.0 mm x 5 µm)	MS	3 ppb	O	9 CC		C ₁₈ -NH ₂		205
ACN:H ₂ O (35:65)	Zorbax-SB (75 x 4.6 mm x 3.5 µm)	MS		H	DHEA y met		Oasis-HLB	95-97	206
ACN:H ₂ O (50:50)	Zorbax-SB (50 x 2.1 mm x 5 µm)	MS	2 ppb	S	BM		Oasis-HLB	70	207
ACN:H ₂ O (25:75)	Zorbax-SB (75 x 4.6mm x 3.5 µm)	MS		Pa					208
ACN:H ₂ O (90:10)	Hypercarb (100 x 2.1 mm x 5 µm)	MS	0.5-10 ppb	H	11 CC		C ₁₈	82-95	209
ACN:H ₂ O Gradiente	Lichrosphere 100 RP-18 (250 x 4.0 mm x 5 µm)	UV MS	2 ppb	Sedim entos	EST, estriol, estrona, DES, PG, NT y levonorgestrol	MeOH:AcEt (1:1)	C ₁₈	66-102	210
MeOH:THF:H ₂ O (20:7:73)	Prontosil C ₁₈ (250 x 2.0 mm x 5 µm)	MS	6 ppb	Pa	T y met				211
MeOH:H ₂ O (65:35)	Hypersil C ₁₈ (250 x 4.0 mm x 5 µm)	MS	30 ppb	O, S	TB y met	TBME	C ₁₈	O 87-128 S 70-74	212
ACN:H ₂ O (60:40)	Allure C ₁₈ (250 x 2.1 mm x 5 µm)	MS	0.2-0.5 ppb	O	B, ANDOA		C ₁₈	92-98	213
ACN:H ₂ O (55:45)	Lichrosphere100 RP-18 (125 x 4.0 mm x 5 µm)	UV		Pa	DZ				214
ACN:H ₂ O (55:45)	Hypersil C18 (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	4 ppb	Pil	MT	MeOH		101-102	215
40mM SDS:PrOH (90:10)	Hypersil C18 (150 x 3.0 mm x 5 µm)	UV	0.6 ppb	Pil	MT	MeOH		101-102	215
ACN:H ₂ O (65:35)	Hypersil C18 (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	2.4 ppb	Cap	DZ	MeOH		99	216
40mM SDS:PeOH (90:2)	Hypersil C18 (150 x 3.0 mm x 5 µm)	UV	3 ppb	Cap	DZ	MeOH		101	216
ACN:H ₂ O (75:25)	ODS 2 (200 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	1 ppb	Pa	Fluticasona			99	217
ACN:H ₂ O Gradiente	Zorbax C ₁₈ (150 x 1.0 mm x 3.5 µm)	MS		A	15 Ester	AcEt	C ₁₈	57-116	218
MeOH:H ₂ O Gradiente	Hypersil BDS C ₁₈ (150 x 2.1 mm x 3 µm)	MS	0.5 ppb	S	T y T-deurerada	DEE		91-96	219
MeOH:H ₂ O:ACN (2:51:47)	Genesis C ₁₈ (150 x 4.6 mm x 4 µm)	UV	1.6 ppb	S	T	DCM:Tri- Me-Pen (3:2)		<92	220
40mM SDS:PrOH (95:5)	Hypersil C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 5 µm)	UV	13-98 ppb	Pa	13 Ester				221
ACN:H ₂ O Gradiente	Genesis RP 18 (50 x 4.6 mm x 3 µm)	MS		S	Ciproterona-A				222
PrOH:40mM SDS (5:95)	Hypersil C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 5 µm)	UV	13-98 ppb	Pa	14 EAA				223
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 5 µm)	MS		O,Pe	ES		C ₁₈ -NH ₂		224

Condiciones cromatográficas		Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
						ELL	EFS		
ACN:H ₂ O Gradiente	Hypersil BDS C ₁₈ (250 x 2.1mm x 3 μm)	MS	5-10 ppt	A	EST, Estrona	AcEt	Florisil C ₁₈	87-97	225
ACN:H ₂ O (40:60)	Alltima C ₁₈ (150 x 2.1 mm x 5 μm)	MS	2-3 ppb	O	5 CC (DM, FLU, TRA, etc)		Oasis HLB	>60	226
MeOH:H ₂ O Gradiente	Chromolith (250 x 4.0 mm)	MSn	10 ppb	F	6 EAA				227
ACN:H ₂ O (40:60)	(250 x 4.0 mm x 4 μm)	UV	10 ppb	Pi	Ciproterona-A	MeOH		102-105	228
32.5mM CTAB:PeOH (99.76:0.24)	Hypersil C ₁₈ (250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV	20-27 ppb	Ta	BM, DM	MeOH		99-101	229
ACN:H ₂ O Gradiente	Nova Pak C ₁₈ (300 x 4.0 mm x 3.9 μm)	UV y MS	10 y 25 ppb	O	DM y met		Oasis HLB AcEt:DEE (2:1)	99	230
MeOH:H ₂ O Gradiente	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈	MS	10-15 pg	S	CLO y met	AcEt	Sep Pak C ₁₈ MeOH	>99	231
MeOH:H ₂ O (30:70)	Waters C ₁₈ (50 x 2.1 mm x 3.5 μm)	MS	1 ppb	S, T	Beclometasona y met	T: AcEt	S: C ₁₈	70 ± 7	232
ACN:H ₂ O (23:77)	ODS (250 x 4.6 mm x 5 μm)	UV		Fluido	DM			99-101	233
ACN:H ₂ O Gradiente	Synergi RP (50 x 1.0 mm x 4 μm)	MS	40 ppb	O	B y met		C ₈	22-79	234
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 5 μm)	MS	0.4 ppb	O, Pe, Pi, Pie	B		C ₁₈ -NH ₂	73	235
ACN:H ₂ O (90:10)	Apolo C ₁₈ (150 x 5.6 mm x 5 μm)	UV	9 ppb	Pa	Clometasona				236
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 5 μm)	MS	1.6 ppb	Pe	EST		C ₁₈	27	237
ACN:H ₂ O (10:90)	Hypercarb (100 x 2.1 mm x 5 μm)	MSn	1-30 ppb	T, Pe	11 CC	MeOH	C ₁₈		238
MeOH:H ₂ O (63:37)	Discovery C ₁₈ (150 x 4.6 mm x 3 μm)	UV	9 82 mmol/L	O	CL, CS		C ₁₈	95-96	239
MeOH:H ₂ O-AcNH ₄ Gradiente	LC-8-DB (33 x 2.1 mm x 3 μm)	MSn		O	19 CC		C ₁₈		240
MeOH:H ₂ O Ac. acético Varias	ODS H-80 (150 x 2.0 mm x 4 μm)	MSn	pg	Pa	Oxoesteroides				241
ACN:H ₂ O Gradiente	Genesis RP 18 (50 x 4.6 mm x 3 μm)	MS		S	NT, EST	Cloruro de butilo		94 y 58	242
ACN:H ₂ O Gradiente	C ₁₈ (100 x 3.0 mm x 5 μm)	MS	5ppb	O	ANDOA y met	DEE		78-97	243
MeOH:H ₂ O-AcNH ₄ Gradiente	Ace C ₈ (50 x 2.1 mm x 5 μm)	MSn	25 ppt	P	8 EAA	TMBE		77-105	244
MeOH:H ₂ O (63:37)	Discovery C ₁₈ (150 x 4.6 mm x 3 μm)	UV		O	CL, CS		C ₁₈	92-103	245
MeOH:H ₂ O (70:30)	(150 x 4.6 mm x 5 μm)	MS		Pa	5 Ester				246
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	C ₈ (150 x 2.1 mm x 5 μm)	MSn	2 ppb	Pe	Esteres de T y B		C ₁₈	97-105	247
ACN:H ₂ O Gradiente	Fenil (250 x 2.0 mm x 5 μm)	MS	1-120 ppb	T, Le	11 Ester		Oasis HLB -NH ₂	>80	248
ACN:H ₂ O Gradiente	Zorbax (150 x 3.0 mm x 3.5 μm)	UV		Pie	MT	MeOH	Oasis HLB -NH ₂	> 95	249
ACN:H ₂ O Gradiente	Supelcosil (100 x 2.1 mm x 3 μm)	MSn		O	15 AAS		C ₁₈	> 70	250

Condiciones cromatográficas		Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
						ELL	EFS		
ACN:H ₂ O (43:57) (46:54)	Luna CN (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	5-13 ppb	In	T-prop, T cipionato	H ₂ O		99-101	251
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	Purospher C ₁₈ (125 x 3.0 mm x 5 µm)	MS		O	5 EAA	DEE Pen			252
ACN:H ₂ O (70:30)	Synergy Max (150 x 4.6 mm x 4 µm)	UV	26 190 ppb	A, Pie	DM	TBME	-NH ₂ IA	95 110	253
ACN:H ₂ O Gradiente	Discovery C ₁₈ (150 x 2.1 mm x 5 µm)	MSn	1ppb	T	10 EAA	MeOH TBME	C ₁₈	64-67	254
ACN:H ₂ O Gradiente	120 ODS-A (150 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	25ppb	A, O	9 Ester		Barra adsortiva	11-100	255
ACN:H ₂ O Gradiente	Altima C ₁₈ (250 x 4.6 mm x 5 µm)	MSn	1ppb	C	10 EAA		C ₁₈	80-100	256
ACN:H ₂ O Gradiente	C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 5 µm)	MSn	1ppb	C	10 Ester	MeOH TBME	C ₁₈	55-77	257
MeOH:H ₂ O Ac. acético Gradiente	Uptisphere C ₁₈ (50 x 2.1 mm x 3 µm)	MSn		O	B y met		NaOH SiOH		258
MeCN:MeOH:10mM FrNH ₄ (10:3:87)	ODS H-80 (150 x 2.0 mm x 4 µm)	MS	60 ppt	P, Ce	T	EtOH		99-106	259
MeOH:H ₂ O Ac. acético Gradiente	LC-8-DB (33 x 2.1 mm x 3 µm)	MSn		O	36 Ester		C ₈ -SCX	30-100	260
MeOH:H ₂ O:AcNH ₄ Gradiente	Luna C ₈ (50 x 2.0 mm x 5 µm)	MSn	13 ppt	O	Altrenogest		C ₁₈	72	261
MeOH:H ₂ O Ac. acético Gradiente	Uptisphere ODB (150 x 3.0 mm x 5 µm)	MSn	1-3ppb	O	T, E-T met		C ₁₈	89-101	262
ACN:H ₂ O (20:80)	Termohipercarb (100 x 2.1 mm x 1.7 µm)	MSn		H	CC	AcEt	C ₁₈		263
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	C ₁₈ (50 x 2.1 mm x 1.7 µm)	TOF		O	100 drogas	Inyección directa con dilución 1:10			264
ACN:H ₂ O:Ac. acético Gradiente	C ₁₈ (50 x 2.1 mm x 1.7 µm)	MSn	≈ppt	A	DM, BM, PL, MPL, FM		Disco Acetona:MeOH		265
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 5 µm)	MSn		O, Pe, Pi, Pie	NT,B, EST, T	AcetatoNa: MeOH (50:50)	C ₁₈ -NH ₂		266
MeOH:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	C ₁₈ (150 x 2.1 mm x 1.7 µm)	MSn		Al	49 Ester	MeOH			267
ACN:H ₂ O:Ac. acético Gradiente	Zorbax C ₁₈ (150 x 2.1 mm x 5 µm)	MS		O	17 Ester			74-113	268
ACN:H ₂ O:Ac. fórmico Gradiente	BEH-C ₁₈ (50 x 2.1 mm x 1.7 µm)	TOF-MS	0.1-3.3 ppb	O	22 CC	DEE			269
ACN:H ₂ O (40:60)	Nucleosil C ₁₈ (250 x 4.6 mm x 5 µm)	F	0.8-1 ppb	H	7 CC	MeOH	C ₁₈	88-106	270
MeOH:H ₂ O (20:80)	YMC C ₈ (150 x 2.0 mm x 5 µm)	MSn	0.1 ppb	Cerebr, P	Neuroesteroides		Strata X	88-103	271
MeOH:H ₂ O:Ac. acético Gradiente	Uptisphere ODB (150 x 3.0 mm x 5 µm)	MSn	40 ppt	O	NT Sulfato		C ₁₈ Bond elut SAX	94	272
MeOH:H ₂ O-AcNH ₄ (20:80)	Waters C ₁₈ (150 x 2.1 mm x 5 µm)	MS	0.5 ppb	T	21 EAA	MeOH	C ₁₈ -NH ₂		273
ACN:H ₂ O Gradiente	C ₁₈ (150 x 3.0 mm x 3.5 µm)	MS		Pie	MT	MeOH	Oasis HLB -NH ₂		274
ACN:H ₂ O (35:65)	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	34-194 ppb	Pie	18 Ester	DEE	SiOH	70-92	275

Condiciones cromatográficas		Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
Fase móvil	Fase estacionaria			Tipo	Analito	Extracción		% E	
ACN:H ₂ O (21:79)	Chromolith (100 x 4.6 mm)	UV	33-43 ppb	Pie	PL, CL, CS, MPL, BM, DM, TRA	ELL	EFS	86-92	276
ACN:H ₂ O (29:71)	Chromolith (100 x 4.6 mm)	UV	27-37 ppb	Pie	FM, B, NE, NT, MT DMT, BLS	ACN	Nexus	83-96	277
ACN:H ₂ O Gradiente	Purospher C ₁₈ (250 x 4.6 mm x 5 µm)	UV	32-50 ppb	A	20 Ester		C ₁₈	93-100	278

II.2. En cromatografía de gases (CG)

En la **Tabla 8** se muestran las referencias encontradas sobre la determinación de esteroides por CG. Se incluyen la fase estacionaria y analitos implicados, entre otras condiciones, así como los aspectos relacionados con la preparación de muestra. Como se observa, la espectrometría de masas (MS) es la detección más empleada, dada la necesidad de identificación de estos compuestos y sus metabolitos en muestras biológicas (principalmente muestras de orina). La derivatización más utilizada se realiza con MSTFA/NH₄I/DTE. Dentro de los procedimientos de preparación de muestra los cartuchos de EFS más utilizados son C₁₈ y -NH₂ y los disolventes más empleados en ELL son DEE, AcEt, EtOH, Pen y TBME.

Tabla 8. Resumen de antecedentes en CG.

Fase estacionaria	Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
			Tipo	Analito	Extracción		Deriv.	
SE-54 (30 m x 0.25 mm)	MS			5α-estrona-3β,17α-diol 5α-androstano-3β,17α-diol NT, T		LH-20	BSA/ TMCS/ Py	279
(25 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		O, T, Testí- culo	NT, T, DHEA, TB	Sulfatos CHCl ₃ :MeOH Glucurónidos CHCl ₃ :MeOH	XAD-2 LH-20	TBDMS	280
Ultra-2 (25 m x 0.20 mm x 0.33 µm) Silar 10 C WCOT Chrompack (25 m x 0.25 mm x 0.19 µm)	MS		Comp. Sinteti- zado	5α-androst-3-en-17-ona				281
CpSil 19CB (25 m x 0.25 mm)		0.1-0.5 ppb	O B	NT		IAC	HFBA en AcEt	282
(Frac. Libre) 5% Fenil-Metil silicona (17 m x 0.2 mm x 0.33 µm) (Frac. Conjugada) HP-1 (17 m x 0.2 mm x 0.11 µm)	MS		O	Frac. Libre FM, ES, DehidrocloroMT, Oxandrolona, Formildienona, Frac. Conjugada CB, NT, NE, B, OM, T, BLS, Metenolona, Oximesterona,	F.Orgánica DEE F.Acuosa DEE	XAD-2	1ª MSTFA/ TMS/ TMSI 2ª MSTFA/ TMSI/ MSTFA/ TMCS	283
Ultra-2 (25 m x 0.2 mm x 0.33 µm)	MS		O	Varios Ester: DHEA, MT, E-T, B, T, BLS, FM, OM		C ₁₈	MSTFA/ TMSI	284
Fenil-metil silicona (16 m x 0.2 mm x 0.33 µm)	MS	1 ppb	O	ES 3-OH-ES	DEE	XAD-2	MSHFB/ TMCS/ TMSI	285
(12.5 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		O	Furazabol	DEE	C ₁₈	MSTFA/ TMSI	286

Fase estacionaria	Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
			Tipo	Analito	Extracción		Deriv.	
					ELL	EFS		
SE-54 (17 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS		O	ES y met.	DEE	XAD-2	MSTFA/ TMSI	287
BPI (25 m x 0.22 mm x 0.25 μm)	FID		O	T, HPG		RP-18 -NH ₂	BSTFA/ TMCS	288
DBI (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		O	Formebolona, met.		C ₁₈	MSTFA/ TMSI	289
DB-5 (25 m x 0.32 mm x 0.25 μm)	FID	0.1 ppm	O	NT, NE, NG		Automatizado Pre-columna IAC (10 x 10.0 mm x 5 μm) Interfase RP C ₁₈ (10 x 2.0 mm x 40 μm)		290
HP-1 (25 m x 0.2 mm x 0.1 μm)	MS		O, P	DHEA		C ₁₈	MSTFA/ TMSI/ DTE	291
Si (25 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS	0.3 ppb	O, T	NT, T, EST, EEST, TB, Z, DES, B Metandiona, MT Megestrol Ac., Clormadiona Ac., MedroxiPG Ac., ClorT, PG, ClorT Ac.	T		HFB	292
					DEE	C ₁₈ MeOH		
					O		MSTFA/ Py/ TMCS	
						C ₁₈ -NH ₂ + C ₁₈		
					Frac HPLC			
HP Ultra-1 (OV-1) (17 m x 0.2 mm x 0.11 μm) HP Ultra-1 (OV-1) (17 m x 0.25 mm x 0.33 μm) SE-54 (17 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS FID		O	Varios esteroides	DEE	XAD-2 MeOH	MSTFA/ IM MSTFA/ NH ₄ I/ DTE o MSTFA/ TMSI	293
HP DB5 (20 m x 0.18 mm x 0.4 μm)	MS		O	NT, met.			MSTFA/ DTE/ NH ₄ I	294
Si (8.5 m x 0.25 m x 0.25 μm)	MS		T	MPL y met.	CHCl ₃	Lipidex 5000 XAD-2	MSTFA/ TMSI	295
HP Ultra-2 (25 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS		O	NT y met.		C ₁₈ + -NH ₂ Frac HPLC	HFBA MSTFA/ TMSI	296
OV-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		O	Varios esteroides		C ₁₈ Silica Gel	MSTFA/ TMSI	297
HP-1 (25 m x 0.32 mm x 0.17 μm)	MS CE	5-10 ppb	O, P	NT, NG	O		HFBA	298
					DEE:EtOH	C ₁₈		
					P			
					AcEt	C ₁₈		
SE-52	MS	2-60 ppt	S	T, EST		Extrelut IA C ₁₈	ACT/ HFBA	299
Ultra-1 (25 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS		P	PG T	Ciclodextrinas DCM		HFBA/ CH	300
BPX-5 (25 m x 0.25 mm)	MS		O	MT y met	DEE	C ₁₈		301
DB-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)	MS	0.5 ppt	O	NT		C ₁₈ + -NH ₂ IA Frac HPLC	MSTFA/ TMSI/ DTE	302
Ultra-1 (12.5 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS		O	Z, NT, TB	DEE	C ₁₈	MSTFA/ TMSI/ DTE	303
HP Ultra-2 (25 m x 0.2 mm x 0.11 μm)	MS		Pa	T, EST, MT, NT, TB, FM, MeB			MSTFA	304
SE-52 (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		O	NT	DEE	RP-18	MSTFA	305
Ultra-2 (20 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS		O	NT, MT, T, DES EST, MeB, B, CT, EEST, TB, CT Ac		Discos Empore C ₁₈	MSTFA/ BSTFA	306

Fase estacionaria	Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
			Tipo	Analito	Extracción		Deriv.	
					ELL	EFS		
Ultra-2 (12 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS MSn		P	T esters	Hex:AcEt		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE PFPA/ TFAA/ HFBA	307
PB-1 (30 m x 0.32 mm)	MS		P	T		Extrelut	PFPA	308
BPX-5 (30 m x 0.22 mm 0.25 μm)	MS		O	NT		C ₁₈	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	309
DB (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) BPX-5 (30 m x 0.22 mm x 0.25 μm)	MS MSn		O	Varios esteroides		C18	MSTFA	310
BPX-5 (25 m x 0.22 mm 0.25 μm)	MS	0.5 ppb	O, R, Hec	B, NG, EtinilEST, FM, NE	O DEE R MeOH + Hex Hec DEE	Frac HPLC	TMS/ MSTFA/ TMSI	311
HP Fused Si / metilsilicano (12 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS	0.1 ppb	P	NT Ac T Ac	DEE DCM		PFPA	312
HP-5 (25 m x 0.25 mm x 0.33 μm) DB-1 (15 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		O	25 EAA (libres y conjugados)	DEE (libres+Gluc.) AcEt (Sulfatos)	C ₁₈	MSTFA/ TMSI/ TMCS	313
ZB5 (25 m x 0.22 mm x 0.25 μm)	MS		O	T, E-T		C ₁₈		314
DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) BPX-5 (30 m x 0.22 mm x 0.25 μm) F XLB (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) DB-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MSn		O	Varios ester		C ₁₈	MSTFA/ Propanotr iol/ NH ₄ I	315
Fenil- dimetil-silicona (17 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS		O	Furazabol	DEE	XAD-2 MeOH	MSHFB/ TMCS/ TMSI	316
HP-1 (17 m x 0.22 mm x 0.11 μm)	MS		O	Varios EAA (libres y conjugados)	Pen:DEE	C ₁₈ MeOH		317
HP-1 (17 m x 0.22 mm x 0.11 μm)	MS		O	Metandienona y ES + met	TBME Pen	XAD-2	MSTFA/ NH ₄ I/ Etanotriol MSTFA/ TMSI	318
HP-1 (16 m x 0.2 mm x 0.11 μm)	MS		S, O	Varios ester		C ₁₈	MSTFA/ TMSI/ DTE	319
HP-1 (17 m x 0.22 mm x 0.11 μm)	MS		O	T, LH	DEE	XAD-2	MSTFA/ TMSI/ DTE	320
BPX-5 (25 m x 0.22 mm x 0.25 μm)	MS		O	ET, DHEA, T, AND, ETIO		C ₁₈		321
OV-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)			O	NT		C ₁₈ -NH ₂	MSTFA	322
DB5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS MSn		O	FM	DCM:PrOH	Bond Elut C ₁₈ Frac HPLC	IM:BSA: TMCS	323
HP Ultra-1 (25 m x 0.20 mm x 0.11 μm)	MSn	0.5-4 ppb	O	BLS, B, T, FM, MT, NT, NE		XAD-2	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	324
BPX-5 (30 m x 0.22 mm x 0.25 μm)			C	Varios ester	MeOH Hex	C ₈ SiOH -NH ₂	MSTFA/ TMSI/ DTE	325
HP-1 (25 m x 0.20 mm x 0.5 μm)	MS		O	Metanolona met		C ₁₈ -SAX	BSA/ Py	326

Fase estacionaria	Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
			Tipo	Analito	Extracción		Deriv.	
					ELL	EFS		
HP Ultra-1 (25 m x 0.20 mm x 0.33 µm)	FID			DHEA CL, otros CC		C ₁₈	MSTFA/ TMSI	327
BPX5 (25 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		O, B	T, NT, EST		C ₁₈	MSTFA/ TMSI	328
BPX5 (25 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		B	T		C ₁₈ Frac HPLC		329
DB-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	MS		Hec	B, NE, T	DEE	Chem Elut -NH ₂ , SiOH Frac HPLC	TMS	330
CP-SIL 5 (60 m x 0.2 mm)	MS		O	TB	TBME	C ₁₈ Frac HPLC	BSTFA/ TMCS	331
DB-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	MS		H, O, Hec	CB, B, met	DEE TBME	Chem Elut Frac HPLC		332
OV-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	MS		H	NT, NorE-T	AcEt:Hex Lavado NaOH	Frac HPLC	MSTFA/ TMIS/ DTE/ TMS	333
HP-5 (25 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		Hec	Varios Ester	O	O		334
						C ₁₈ -NH ₂ + C ₁₈		
					T	T		
					DEE MeOH	Frac HPLC		
DB-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	MS CIMS		O	Ester y met		C ₁₈ Lavado NaOH Frac HPLC	MSTFA/ TMIS	335
OV-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		Hec	Ester		SiOH SiOH,-NH ₂ -NH ₂ C ₁₈	MSTFA/ DTE	336
CP-SIL 5 (60 m x 0.25 mm x 0.1 µm)	MS		O	NT, T		C ₁₈ -NH ₂ IA		337
DB-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	MS		H	Metandienona y met	DEE	Frac. HPLC	BSTFA/ TMCS/Py	338
	MS		Solución Enzim.	Metandriol		C ₁₈		339
OV-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS RMN		O	TB y met		C ₁₈ SiOH	MSTFA- I ₂	340
Optima-1 (25 m x 0.20 mm x 0.1 µm)	MS		Pe	T		C ₁₈ LH-20	HFBA	341
DB-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	MS		O, Hec	B y met		Chem Elut Frac HPLC		342
	MS		O	CB y met		C ₁₈ SiOH	MSTFA/ TMSI/ DTE	343
HP-1 (17 m x 0.22 mm x 0.11 µm) (25 m x 0.22 mm x 0.11 µm)	MS			DHEA, T, E-T, AND, E-AND, ETIO		C ₁₈ LH-20	TBDMS	344
SE-52 (25 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS	0.1 ppb	C, O	6 Ester	TBME	C ₁₈		345
(25 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS	0.2 ng/inYE	C	12 Ester (NT,Z, etc)	Gel de inmunofinidad		BSTFA/ TMCS	346
HP-5 (25 m x 0.20 mm x 0.33 µm)		0.01- 0.04 ppb	O	NT y met.	Hex:DEE	C ₁₈ LH-20	MSTFA/ TMSI	347
HP-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		O	NT		C ₁₈ lavado NaOH SiOH Frac HPLC-NH ₂	MSTFA/ TMIS/ DTE MSTFA/ TBDMS Cl/NH ₄ I/ ACN/Py	348
HP-50 (30 m x 0.25 mm x 0.15 µm)	MS		O	T		C ₁₈	Py	349
HP-1 (16 m x 0.2 mm x 0.11 µm)	MS	0.3 ppb	O	Metandienona met		C ₁₈	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	350
CP-Sil-8CB (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS	0.07- 6.20 - ppb	Pe	B, MT, NT, T y ésteres	AcEt	-NH ₂ AcEt SiOH-gel CHCl ₃	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	351

Fase estacionaria	Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
			Tipo	Analito	Extracción		Deriv.	
					ELL	EFS		
(17 m x 0.20 mm x 0.11 μm)	MS	0.02-0.5ppb	Pe	ANDOA, AND, DHEA, T, PREG	NaOH Pen		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	352
BPX-5 (25m x 2 μm)	MS		B	NT y met		C ₁₈	MSTFA	183
MXT-1 (30 m x 00.28 mm x 0.25 μm)	MS	15-20 pg	O	AND, ETIO, CetoAND, CetoETIO, HidroxiAND, DHEA, T (glucoronidos)		PAD-1	MSTFA/ TMCS	353
BPX-5 (25 m x 0.22 mm x 0.25 μm)	MS		Cerebro de rata	PREG, PG, DHEA y ésteres		C ₁₈ Frac HPLC Lichrosorb Diol		354
OV-101 (35 m x 0.22 μm)			O	DHEA, AND, ETIO, CLO met			MSTFA Py	355
DB-5 (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS	1-2 pg	Pe	EST, Estrona	EtOH Hex		CDFAA/ isoBOC	356
ZB-5 (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS	1 ppt	A	Oestrona, EST		Discos C ₁₈	MBSTFA /TBDMS	357
OV-101 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		O	Etiocolanolona DHEA, E-T, Estrona, EST		C ₁₈	MSTFA/ TMSI	358
HP5 Ultra 2 (12 m x 0.2 mm x 0.33 μm)	MS	0.03 ppm	Pe	Varios Ester	Hex		MSTFA/ NH ₄ I/ 2Mercapt oetanol	359
CP SIL 8 CB (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		Pe	Nandrolona, EST, T, B, MT	AcEt		MSTFA/ NH ₄ I/ 2Mercapt oetanol	360
HP-1 (17 m x 0.2 mm x 0.11 μm)	MS		O	DHEA, ANDOA, NOA, Androstendiol		C ₁₈	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	361
SPB-1 (10 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS	2 ppb	O	MT met		C ₁₈	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	362
BPX-5 (12 m x 0.22 mm x 0.33 μm)	MS		O	DMT y met		C ₁₈	MSTFA/ TMSI	363
HP Ultra-1 (OV-1) (17 m x 0.2 mm x 0.11 μm)	MS	0.1-0.2 ppt	O	T, PREG	Pen		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	364
BPX-5 (12 m x 0.22 mm x 0.33 μm)	MS		P	DMT y met		C ₁₈	MSTFA/ TMSI	365
HP Ultra-1 (OV-1) (25 m x 0.22 mm x 0.11 μm)	MS		O	MPL y met.	TBME		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	366
(30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		O	NT, DES	DEE	C ₁₈	HFAA	367
DB-17 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	IRMS	60 ng	O	Norandrosterona		C ₁₈	MSTFA/ NH ₄ I/	368
HP (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MSn	0.03, 0.01-0.06 ppb	O	Nandrolona, NOA y Noreticokolanolona		C ₁₈	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	369
DB5-MS (15 m x 0.25 mm x 0.1 μm)	TOF-MS		O	CLE, MT, ES, NT y Metandienona			MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	370
BPX-5 (25 m x 0.25 mm)	IRMS		Med	T	Hex		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	371
HP Ultra-1 (17 m x 0.2 mm x 0.11 μm)	MSn	2 ppb	Al, O	10 Ester: NT, T, DMT, etc	NaOH:Pen	Frac HPLC	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	372
Quadrex (15 m x 0.25 mm x 0.1 μm)	MS		Fluido	TRA	DEE		Py	373
BPX5 (25 m x 0.22 mm x 0.25 μm)	MSn	2 ppb	H, C	DES, ZE, NT, MT, B, etc	MeOH DEE	SiOH	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	374
BPX5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	MS		C	T, MT, DES, PROG, ET, PREG	MeOH:H ₂ O, Hex-AcEt		TMSI	375
HP-1 (17 m x 0.2 mm x 0.11 μm)	MS		P	OM	TBME		MSTFA/ NH ₄ I/ Mercapto-etanol	376
Hp-5 (30 m x 0.25mm x 0.25 μm)	MS		Pa	Ester met	Cloruro de metileno		BSTFA/ TMCS	377

Fase estacionaria	Detec.	LD	Preparación de muestra					Ref.
			Tipo	Analito	Extracción		Deriv.	
					ELL	EFS		
ZB-5 (15 m x 0.25mm x 0.25 µm)	MSn	0.3 ppb	O	4 T met		C ₁₈	Py	378
Ultra (25 m x 0.32 mm)	MS	2 pg	Pe, S	DHEA y met		C ₁₈ SiOH	TMSI/Py	379
HP-Ultra 1 (25 m x 0.2mm x 0.11 µm)	MS	2 ppb	O	CLE, NT, MT, etc.		Frac HPLC	MSTFA/ TMSI/ DTE	380
DB-5 (30 m x 0.25mm x 0.25 µm)	MSn	0.1-0.4 ppb	C	10 EAA	H ₂ O/MeOH	C ₁₈	MSTFA/ TMSI/ DTE	381
SGE-BXP 5 (25 m x 0.22mm x 0.25 µm)	MSn	1-10 ppb	Pe	15 EAA: NT, T, B, etc.		C ₁₈	MSTFA/ TMSI/DTE	382
Hp-5 (30 m x 0.25mm x 0.25 µm)	MS	1-3 nM	S	DHEA, PREG		Frac HPLC	BSTFA/ TMCS	383
MDN (30 m x 25mm x 0.25 µm)	MS		O, Pie	6 Ester: EST, etc		C ₁₈	MSTFA/ TMSI/DTE	384
DB-5MS (30 m x 25mm x 0.25 µm)	MS		Pa	Tetrahidogestrino- na			MSTFA/ TMSI/DTE	385
OV-1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MSn	0.2 ppb	Pe	DES, MT, EST	DEE	-NH ₂ SiOH	MSTFA/ TMSI/ DTE	386
ZB-50 (15 m x 0.25 mm x 0.15 µm)	MS		Pa	DHEA			BSTFA/ TMCS	387
DB1-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS	0.1-0.4 ppb	C	Z, PG, DES, EST, estriol, estrona, etc.	MeOH / EFS-C ₈	SiOH -NH ₂	MSTFA/ TMSI/DTE	388
DB-XLB (15 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MSn		O	ES		C ₁₈	MSTFA/ TMSI/DTE	389
HP-Ultra 1 (17 m x 0.22 mm x 0.11 µm)	MS	5ppb	O	AND met		ResinaPADII	MSTFA/ TMSI/DTE	390
DB5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm)	MS		A	Estrona, EEST			BSTFA/ TMCS/Py	391
DB5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		O	EST, DHEA	Pen	C ₁₈ SiOH	MSTFA/ TMSI/DTE	392
MDN (30 m x 25 mm x 0.25 µm)			Pa	EST			TMS	393
HP-5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS	0.01- 1.6 ppb	A, S	DES, DHEA, T, PREG, etc		SPME poliacrilato	BSTFA	394
Ultra 1 (17 m x 0.20 mm x 0.11 µm)	MS		O	DZ			VARIAS	395
HP-1 (16 m x 0.2 mm x 0.11 µm)	MS		O	5 EAA	DEE		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	396
DB1-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS	0.3ppb	Te	9 Ester	TBME		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	397
OV1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		O	B y esteres		SiOH	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	398
BPX-5 (25 m x 22 mm x 0.25 µm)	MS	≈ ppt	A	DM, BM, PL, MPL, FM		Disco Acetona:MeOH	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	399
OV1 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	MS		O, Pe, Pi, Pie	EST, T, NT, B		C ₁₈ +-NH ₂	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	400
BPX-5 (25 m x 22 mm x 0.25 µm)	MSn	2-10 ppb	O	17 Ester		C ₁₈ +-NH ₂	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	401
Rtx-5MS (30 m x 25 mm x 0.25 µm)	MS	1.2-1.4 ppb	O	NT, B		C ₁₈ +-NH ₂	MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	402
VF-5MS (30 m x 25 mm x 0.15 µm)	MS	1 ppb	O	13 EAA		C ₁₈ -Oasis HLB	2 Métodos	403
OV-1 (30 m x 25 mm x 0.25 µm)	MS	2-19 ppb	Pe	28 Ester		SiOH,-NH ₂	MSTFA	404
HP Ultra 1 (17 m x 0.2 mm x 0.11 µm)	MS	0.1 ppb	O	T, MT, NT met		C ₁₈	MSTFA/ NH ₄ I	405
ZB-5 (30 m x 25 mm x 0.25 µm)	MS	10-21 ppb	Pie	DHEA, NT, B, NE, DMT, MT, BLS	ACN, AcEt		MSTFA/ NH ₄ I/ DTE	406

II.3. Artículos sobre revisiones

En la siguiente lista se recogen en orden cronológico los artículos consultados sobre revisiones relacionadas con los esteroides. Se nombra el título de la publicación y referencia.

Título de revisión	Ref.
“Analytical Chemistry at the Games of the XXIIIrd Olympiad in Los Angeles, 1984”	407
“High-performance liquid chromatographic separation and detection methods for anabolic compounds”	408
“Liquid chromatographic purification and detection of anabolic compounds”	409
“On-line sample treatment for/ or via column liquid chromatography”	410
“Chromatographic techniques-the basis of doping control”	411
“Methods for urinary testosterone analysis”	412
“Issues in detecting abuse of xenobiotic anabolic steroids and testosterone by analysis of athletes’ urine”	413
“Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic and clinical toxicology”	414
“Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents”	415
“Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids”	416
“Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology”	417
“Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices”	418
“Is there a place for hair analysis in doping controls”	419
“Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids”	420
“Steroid analysis for medical diagnosis”	421
“High-performance liquid chromatographic analysis of dehydroepiandrosterone”	422
“Gas chromatography”	423
“Recent developments in the use and abuse of growth promoters”	424
“Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples”	425
“Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry”	426
“Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment”	427
“Recent advances in the analysis of steroid hormones and related drugs”	428
“Monitoring anabolic steroids in meat-producing animals. Review of current hyphenated mass spectrometric techniques”	429
“Application of hyphenated mass spectrometric techniques to the determination of corticosteroid residues in biological matrices”	430
“Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review”	431

“Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products”	432
“Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production”	433
“Developing new reference materials for effective veterinary drug-residue testing in food-producing animals”	434
“Effects of metabolic modifiers on carcass traits and meat quality”	435

II. 4. Comentarios sobre la revisión bibliográfica

Como se puede observar en la **Tabla 7**, la determinación de esteroides mediante HPLC se ha realizado tradicionalmente con detección UV y debido a la necesidad de confirmación y a los recientes avances en instrumentación ha ido en aumento la utilización de detectores MS. También se observa que los procedimientos de preparación de muestra han sido dirigidos a matrices biológicas principalmente orina. Sin embargo recientemente se ha propuesto al pienso como una matriz alternativa para la detección de esteroides oralmente activos, describiéndose a partir de 1998 hasta la fecha 7 métodos para la determinación de esteroides oralmente activos en distintos tipos de pienso (generalmente mezclas sencillas). Así, se han descrito métodos aplicados a muestras de pienso usando LC-UV para determinar varios CC mediante ELL con DCM/Hex y EFS (SiOH y C₁₈) (**186**); para DM, FLU y TRA mediante ELL con TBME y EFS (polimérico y -NH₂) con detección UV y MS (**190**); para B mediante ELL con acetato:MeOH, EFS (C₁₈ y -NH₂) y fraccionamiento en una columna C₁₈ utilizando LC con detección mediante MS (**235**); para MT mediante ELL (Hex:MeOH:H₂O) y EFS (polimérico) con detección UV (**249**); para DM mediante ELL con TBME y EFS (-NH₂ y de immunoafinidad) con detección UV (**253**); para 5 esteroides mediante ELL con acetato:MeOH (50:50) y EFS (C₁₈ y -NH₂) con detección mediante MS (**266**) y otro para MT mediante ELL con MeOH y EFS (polimérico y -NH₂) con detección mediante MS (**274**). También, se han desarrollado métodos por LC en muestras de leche en polvo para determinar 10 corticoides mediante EFS (C₁₈) con detección mediante MS (**181**); para 5 esteroides mediante ELL con 0.1M HCl y EFS (polímero y MIP) con detección UV (**199**) y 11 esteroides mediante ELL con MeOH:H₂O y EFS (polimérico y -NH₂) con detección mediante MS (**248**). Respecto a los métodos para determinar esteroides, previamente derivatizados, mediante GC se observa (**Tabla 8**) que han sido desarrollados para matrices biológicas (principalmente orina y tejidos) con detección mediante MS dada la necesidad de confirmación. Se han desarrollado métodos usando GC-MS en muestras de pienso para 5 esteroides mediante ELL con acetato:MeOH (50:50) y EFS (C₁₈ y -NH₂) (**266**) y para 6 esteroides mediante ELL con MeOH y EFS (C₁₈) (**384**). También se ha desarrollado un método en muestras de suplementos alimenticios para humanos para 10 esteroides mediante EEL con NaOH:Pen y fraccionamiento en una columna C₁₈ mediante LC (**372**).

CAPÍTULO III

Desarrollo y validación de métodos para la determinación de esteroides en piensos y aguas de consumo animal

III.1

**Desarrollo y validación de un método por HPLC para la
determinación de esteroides (corticoides y anabolizantes)
en pienso**

III.1.1. Introducción

El control de la administración ilegal de esteroides (corticoides y anabolizantes) se lleva a cabo mediante el análisis de diferentes matrices en varias etapas de la cadena de producción de carne (e.g. inspección de pienso) [1]. El pienso es una matriz rica en aceites y grasas (e.g. el pienso para peces contiene aceite de peces, sangre, soja, trigo), vitaminas (e.g. A, B, C, D y E) y conservantes (e.g. etoxiquinina, ácido propionico) [2]. El análisis de esteroides en pienso no es una tarea fácil debido al gran número que pueden ser añadidos, a su similitud estructural y a la complejidad de la matriz.

Para determinar y prevenir el uso de esteroides se requieren métodos eficientes y fiables. Éstos se dividen en dos categorías: de criba y confirmación. El objetivo de los métodos de criba es encontrar y seleccionar muestras sospechosas para su posterior confirmación [3].

Se han desarrollado varios métodos mediante GC-MS para la detección de esteroides previa derivatización de la muestra [4]. LC es particularmente apropiada para el análisis de compuestos no volátiles y térmicamente sensibles. LC-MS ha sido aplicada con éxito en métodos criba y de confirmación de CC en matrices biológicas [5] y en métodos criba de EAA en tejidos de animales [6]. LC-MS tiene la desventaja de ser costosa y no estar disponible en todos los laboratorios. Sin embargo, LC-UV es una técnica práctica, menos costosa y conveniente para el análisis de rutina de esteroides [7].

El presente trabajo consistió en la optimización de la separación de una mezcla compleja de 18 esteroides (corticoides y anabolizantes) mediante LC usando una columna Hypersil ODS, un flujo de 1 mL/min y detección UV a 245 nm (dehidroepiandrosterona a 200 nm). El desarrollo del método utiliza fases móviles acuosas desde binarias hasta cuaternarias de MeOH, ACN o THF y temperatura. La separación óptima se consiguió usando H₂O:ACN (65:35, v/v) como fase móvil a 30 °C, permitiendo la separación de 16 de 18 esteroides en un tiempo de análisis cercano a 30 min. La retención de los esteroides fue relacionada con su hidrofobicidad y estructura, pudiéndose clasificar los esteroides en 3 grupos. Para mejorar la separación se ensayaron varias columnas de alquil-sílica: Tipo A (Lichrospher C₈) y Tipo B (Luna C₁₈, Kromasil C₁₈, Purospher C₁₈ y Synergi C₁₈). Se seleccionó la columna Hypersil como la mejor opción para posteriores experimentos teniendo en cuenta la resolución, número de compuestos separados y tiempo de análisis. La separación óptima se aplicó al análisis de esteroides en muestras de pienso para lechones. La preparación de muestra incluyó una lixiviación con DEE y EFS con cartuchos de SiOH. La validación del método se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por la UE para métodos criba cuantitativos tales como selectividad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad [8].

Referencias

- [1] A. Lommen, R. Schilt, J. Weseman, A.H. Roos, J.W. van Velde, M.W.F. Nielsen, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 28 (2002) 87.
- [2] A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. B**, 824 (2005) 107.
- [3] L.K. Amundsen, J.T. Kokkonen, S. Rovio, H. Sirén, **J. Chromatogr. A**, 1040 (2004) 123.
- [4] S. Görög, **Anal. Sci.**, 20 (2004) 767.
- [5] G. Balizs, A. Hewitt, **Anal. Chim. Acta**, 492 (2003) 105.
- [6] C.L. Xu, X.G. Chu, C.F. Peng, Z.Y. Li, Y. Wang, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 41 (2006) 616.
- [7] R. Gatti, E. Cappellin, B. Zecchin, G. Antonelli, P. Spinella, F. Montero, E.F. De Palo, **J. Chromatogr. B**, 829 (2005) 154.
- [8] Commission of EC. Council Directive 2002/657/EC. **Off. J. Eur. Communities**, L221 (2002) 8.

Liquid chromatographic method development for steroids determination (corticoids and anabolics) Application to animal feed samples

R. Gonzalo-Lumbreras^a, R. Muñiz-Valencia^a, A. Santos-Montes^b,
R. Izquierdo-Hornillos^{a,*}

^a *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain*

^b *Departamento de Ingeniería Mecánica, Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad Pontificia Comillas, Alberto Aguilera 25, 28015 Madrid, Spain*

Available online 1 February 2007

Abstract

A LC isocratic separation study of a complex mixture containing 18 steroids (corticoids and anabolics), used potentially as growth promoters, was carried out. For this purpose, using a Hypersil ODS column at controlled temperature, mobile phases (from binary to quaternary) prepared from water and MeOH, ACN or THF as organic modifiers and UV detection at 245 nm, were employed (dehydroepiandrosterone was detected at 200 nm). The optimum separation was achieved using water/acetonitrile (65:35, v/v) as mobile phase at 30 °C, allowing the separation of 16 out of 18 steroids in about 30 min. The retention scale using optimized binary mobile phases was related with steroids hydrophobicity and structure, allowing a classification into three groups for these compounds. To improve the separation several alkyl–silica packings were tested: Type A (Lichrospher C8) and Type B (Luna C18, Kromasil C18, Purospher C18 and Synergy C12). Taking into account resolution, number of separated compounds and run time analysis the Hypersil column was selected as the best choice for further applications. Calibration graphs were obtained using fluorocortisone, fluoxymesterone or methylprednisolone as internal standard. The optimized separation was applied to the analysis of piglet feed samples spiked with steroids. The sample preparation process included solvent extraction using diethyleter and solid phase extraction using silica cartridges. The recoveries were in the range 70–92%. Decision limits and detection capability were in the range 34–198 and 41–249 µg/kg, respectively. Repeatability was also evaluated.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Steroids; Reversed-phase columns; Animal feed

1. Introduction

Steroid hormones are often classified by their biological activity into androgens, oestrogens, progestogens, glucocorticoids and mineralocorticoids. Corticoids and androgens have different structures: C21 and a keto function on C20 and C17 with hydroxyl groups on C17β, respectively [1].

Glucocorticoids (CC) are important medications prescribed for immune-mediated conditions, such as solid organ transplantation, autoimmune diseases, and malignancies. Both synthetic and natural glucocorticoids possess anti-inflammatory and immunosuppressive properties [2]. Androgenic anabolic steroids (AAS) promote the growth of skeletal muscle (anabolic

effects) and development of male sex hormones (androgenic effects). AAS are used as therapeutic agents for the restoration of muscle size and strength [3].

Some natural and synthetic steroids have been used as growth promoters in animal feeds or have been administered directly to the animals [4]. Because of the danger of residues of these hormones being present in foods for human consumption, the use of steroids as growth promoters have been banned in all the member states of the EU [5–9]. Illegal steroid administration is monitored by analysis of different matrices at various stages in the food chain, e.g. feed inspection and control in farms [10]. Animal feed is very rich in oils and fat, e.g. fish feed contains fish oil, blood meal, feather meal, soybean meal, wheat flour, etc., and is enriched with vitamins (A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, D and E), minerals (salts of Fe, Mn, Zn, Cu, Se, etc.) and preservatives such as ethoxyquin and propionic acid [11]. Due to the large number of steroids potentially added to animal feed, their

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4365; fax: +34 91 394 4329.
E-mail address: hornillo@quim.ucm.es (R. Izquierdo-Hornillos).

structural similarity as well as the complexity of feed matrix and the low steroid concentration in feed, analysis of steroids is a challenging task.

Efficient and reliable analytical methods to monitor and prevent the abuse of steroids are required. These methods are generally divided into two categories: screening procedures and methods of confirmatory analysis. The aim of screening is to find and select suspicious samples for further analysis. An ideal screening method should be sensitive, fast, easy to perform, and has sufficient sample capacity [1].

GC–MS has long been accepted as a powerful technique for the screening and confirmation of the presence of prohibited substances in biological samples. Many methods for measuring steroids have been developed using GC–MS, since it provides good sensitivity and are sufficient specific for use as a confirmatory technique [12,13]. LC is particularly suited for the analysis of polar, non volatile and heat-labile drugs that cannot be adequately handled by GC–MS. In addition, tedious derivatization steps can often be omitted. Many determination methods for AAS and CC using LC–UV or MS detection are overviewed [12–14]. LC–MS has been successfully used for the screening and confirmation of CC in several biological matrices [15–19], for screening the abuse of AAS in urine [20,21] and animal tissue [22]. LC–MS have the disadvantage of being expensive and

not available in all laboratories. However, LC–UV is a practical and cheaper technique [23] suitable for the screening and routine detection of CC in cosmetic products [24,25] and steroids in urine and pharmaceuticals [26,27]. Moreover, LC–UV or MS has been also proposed for the analysis of AAS in feed samples [11,28].

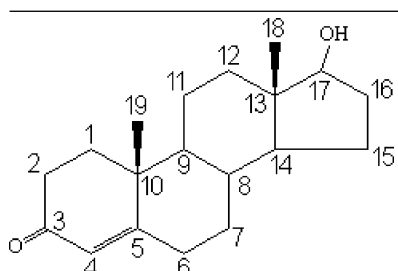
In the present paper, a LC systematic optimisation method of a complex mixture including 18 steroids (CC and AAS) named CAS (Table 1) is described. The proposed method includes controlled temperature, the use from binary to quaternary mobile phases and selected stationary phases from conventional to high purity silica materials. In this way, 16 out of 18 steroids were separated in about 30 min using a water–acetonitrile (65:35, v/v) as mobile phase and a Hypersil ODS column. The proposed method was applied to feed samples previous sample preparation.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Triamcinolone (TRI) (9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17,21-tetrahydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), prednisolone (PL) (1,4-pregnadiene-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dione), prednisone (PS) (17 α ,21-dihydroxy-1,4-pregnadiene-3,11,20-trione), cortisol

Table 1
Structures of CAS (corticoids and anabolics)



	C1–2	C3	C4–5	C5–6	C7	C9	C11	C16	C17	C19
Triamcinolone (TRI)	=					–F	–OH	–OH	–COCH ₂ OH	
Prednisolone (PL)	=						–OH		–COCH ₂ OH	
Prednisone (PS)	=						=O		–COCH ₂ OH	
Cortisol (CL)							=OH		–COCH ₂ OH	
Fluorocortisone (FL)						–F	–OH		–COCH ₂ OH	
Cortisone (CS)							=O		–COCH ₂ OH	
Methylprednisolone (MPL)	=			–CH ₃ C6			–OH		–COCH ₂ OH	
Betamethasone (BM)	=					–F	–OH	–CH ₃ β	–COCH ₂ OH	
Dexamethasone (DM)	=					–F	–OH	–CH ₃ α	–COCH ₂ OH	
Fluoxymesterone (FM)						–F	–OH		–CH ₃	
Boldenone (B)	=									
Deflazacort (DF) (*)	=						–OH		–COCH ₂ OCH ₃	
Nortestosterone (NT)										–H
Metandrostenolone (DMT)	=								–CH ₃	
Norethindrone (NE)									–C \equiv CH	–H
Methyltestosterone (MT)									–CH ₃	
Dehydroepiandrosterone (DHEA)		–OH	–	=						
Bolasterone (BLS)					–CH ₃				–CH ₃	

(*) Oxazol group:

$$\begin{array}{c} \text{C}_{16} \dots - \text{N} = \text{C} - \text{O} - \dots \text{C}_{17} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

(CL) (11 β ,17 α ,21-trihydroxypregnene-4-en-3,20-dione), fluorocortisone (FL) (9 α -fluoro-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione), cortisone (CS) (4-pregnene-17 α ,21-diol-3,11,20-trione), methylprednisolone (MPL) (6 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), betamethasone (BM) (1,4-pregnadiene-3,20-dione-9 α -fluoro-16 β -methyl-11 β ,17 α ,21-triol), dexamethasone (DM) (1,4-pregnadiene-3,20-dione-9 α -fluoro-16 α -methyl-11 β ,17 α ,21-triol), deflazacort (DF) ((11 β , 16 β)-21-(acetyloxy)-11-hydroxy-2'-methyl-5'H-pregna-1,4-diene[17,16-d]oxazole-3,20-dione), boldenone (B) (1,4-androstadien-17 β -ol-3-one), bolasterone (BLS) (17-hydroxy-7,17-dimethylandroster-4-en-3-one), dehydroepiandrosterone (DHEA) (5-androsten-3 β -ol-17-one), fluoxymesterone (FM) (9 α -fluoro-11 β ,17 β -dihydroxy-17-methyl-4-androsten-3-one), norethindrone (NE) (19-nor-17 α -ethinyl-4-androsten-17 β -ol-3-one), 19-nortestosterone (NT) (17 β -hydroxy-19-norandroster-4-en-3-one), methandrostenolone (DMT) (17 β -hydroxy-17 α -methyl-1,4-androstadien-3-one), methyltestosterone (MT) (17-hydroxy-17-methylandroster-4-en-3-one) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). HPLC-grade methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain) and diethyleter (DEE) from Carlo Erba (Milan). Bond Elut SI cartridges (3 ml and 500 mg) from Varian (Harbor City, CA, USA) were used. Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Millipore 0.45 μ m Nylon filters (Bedford, MA, USA) were also used. Other used chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Apparatus

The chromatographic system consisted of the following components all of them from Jasco Analítica (Madrid, Spain): A PU-2089 plus solvent delivery system, a multiwavelength MD-1510 photodiode-array detector (DAD) covering the range 190–600 nm and interfaced to a computer for data acquisition. A 6-port Rheodyne valve with a 20 μ l sample loop injector (Cotati, CA, USA), a Jones-Chromatography block heated series 7960 for thermostating columns in the range 30–70 °C (Seagate Technology, Scotts Valley, CA, USA) were also used. The following reversed-phase columns were used: a bonded-silica Hypersil ODS (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m) (HYP), a Luna ODS (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m) (LC18) and a Synergi RP-MAX C12 (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m) (SM12) from Phenomenex (Torrance, CA, USA); a Lichrospher C8 (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m) (LIC8) and a Kromasil C18 (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μ m) (KR18) from Scharlab (Barcelona, Spain), and a Purospher STAR C18 (250 mm \times 4.6 mm; 5 μ m) (PUR) from Merck (Darmstadt, Germany). A vortex mixer Mixo-Tub-30 from Crison (Barcelona, Spain) and a Visiprep vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were also used.

2.3. Mobile phase

The mobile phases were prepared daily by mixing Milli-Q water with methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), or tetrahydrofuran (THF) at the required volume ratio by programming the pump. All solvents and mobile phases were firstly filtered

under vacuum through 0.45 μ m Nylon filters and degassed using a vacuum degasser.

2.4. Chromatographic analysis

Once the column had been conditioned with the mobile phase, chromatograms were obtained at the programmed temperature (range 30–50 °C). For optimization purposes based on the use of different mobile phases, a methanolic solution containing a single steroid or an appropriate mixture of them (5 μ g ml⁻¹) was injected (20 μ l). The flow-rate was 1.0 ml min⁻¹ and UV absorbance-DAD detection in the range 190–360 nm was used. Peaks identification and peak purity of CAS were performed by comparison of their retention time and UV spectra with those of compounds previously registered by injection of each one individually. With exception to DHEA which was monitored at 200 nm, steroids analysis was carried out at 245 nm.

2.5. Animal feed samples preparation

Animal feed for piglets was kindly supplied from Nutral (Madrid, Spain) with the following composition in w/w units: humidity (7.6%), protein (20.9%), fat (7.0%), fiber (2.1%), ashes (5.7%), Ca (0.62%) and P (0.46%).

2.5.1. For CAS analysis

One gram of feed was placed in a stoppered centrifuge tube. The samples were spiked with a steroid standard mixture within the 0.2–2.0 mg/kg range and leaching with 4 ml DEE. The mixture was shaken for 3 min and centrifuged for 10 min at 3700 \times g. The organic phase was removed from the mixture and processed through silica cartridges which previously had been conditioned with 5 ml DEE (the washing step using DEE was not performed to prevent the elution of some anabolics). The elution of CAS was performed with 5 ml MeOH. The eluate was evaporated to dryness under nitrogen sparge. The dried residue was dissolved using 200 μ l MeOH and 20 μ l were injected into the HPLC system.

Feed samples were previously checked for steroids following the above procedure with negative results.

2.5.2. For CAS recoveries

Blank samples were prepared following the procedure described above. Recoveries, % *R*, for corticoids and anabolics were assessed using a Hypersil ODS column and H₂O/THF (75:25, v/v) and H₂O/ACN (65:35, v/v) as mobile phases, respectively. For this purpose, two different calibration graphs were used. The first one was obtained by adding standard solutions of CAS in the 1.0–10 μ g ml⁻¹ range to the dried residue obtained from blank samples, and the slope, *S*₁, were calculated in each case. A second calibration graph was also obtained from feed samples spiked with CAS in the 0.2–2.0 mg/kg range (equivalent to 1.0–10 μ g ml⁻¹) after applying the above described extraction process (Section 2.5.1), and the corresponding slope, *S*₂, was calculated in each case. The % *R* were calculated using equation $R(\%) = (S_2/S_1) \times 100$. The % *R*-values

obtained for CAS were independent of the concentration range used.

3. Results and discussion

3.1. Column selection

Column selection was based on the results previously obtained by the authors dealing with the HPLC separation of complex mixtures containing corticoids (CC) [29], urinary steroids (URST) [27], and natural and synthetic anabolic steroids (AAS) [26] was carried out. Satisfactory results were obtained for these complex mixtures using a Hypersil ODS column (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) (30 °C) which was selected for the experiments herein considered.

3.2. Separation characteristics of CAS using a Hypersil ODS column and different organic modifiers

An optimization strategy requiring spherical coordinates which includes ACN, MeOH, THF and water has been used to develop a method for the separation of 7 CC [30]. Glajch's method [31] based on the use of mobile phases containing aqueous solutions and typical organic modifiers has also been efficiently applied to optimize the separation of complex mixtures of steroids in HPLC [26,27,29]. This method has also been applied to a complex mixture containing corticoids and anabolics (CAS), used potentially as growth promoters, to study the influence of ACN, MeOH, THF and their mixtures on CAS separation.

The triangle vertices A, B and C (binary mobile phases) were assessed using MeOH (55–59%), ACN (32–40%) and THF (24–28%), respectively. The retention factors, k , were obtained from CAS and KNO₃ retention times. When retention factors ($\ln k$) for any compound were plotted versus the organic modifier concentration, ϕ , linear plots were obtained which are in agreement with the equation: $\ln k = -S\phi + \ln k_w$, where S and $\ln k_w$ (slope and intercept), are the solvent strength parameter and the retention factors in a purely aqueous mobile phase, respectively [32,33]. As expected, the S -values for any CAS, obtained from the slopes of the straight lines, generally follow the sequence: THF > ACN > MeOH.

The use of binary mobile phases provided the following results: 14 and 15 steroids were separated using 55% and 57–59% MeOH, respectively. However, PS/CL, BM/DM and DF/NE coelute in all the range studied and additionally DMT/DF/NE for 55% MeOH. Fifteen steroids were separated using 32% and 38–40% ACN, and 16 using 35–37%, respectively. Under these conditions, several coelutions were observed: PS/CL and FL/CS in all the range studied and additionally DF/DMT using 32% ACN and DF/NT using 38–40% ACN. Thirteen steroids were separated using 24–28% THF, coeluting BM/FM/DMT, DM/DF/NT and NE/MT in all the range studied. From these results, the optimal separation for the A vertex was achieved using H₂O–MeOH (43:57, v/v). Under these conditions 15 CAS were separated in about 29 min. Similarly, the B vertex was achieved using H₂O–ACN (65:35, v/v). Under these

conditions, 16 CAS were separated in about 32 min. The C vertex was achieved with H₂O–THF (74:26, v/v) and 13 CAS were separated in about 29 min.

The middle side points of the triangle D, E and F (ternary mixtures) and the centroid (G quaternary mixture) were also studied. The D point was obtained with H₂O–MeOH–ACN (54:28.5:17.5, v/v/v). Under these conditions 13 CAS were separated in about 45 min with a PS/CL/FL and MPL/BM/DM coelution. The E point was obtained with H₂O–MeOH–THF (58.5:28.5:13, v/v/v) and 15 CAS were separated in about 24 min and coeluted MPL/BM and FM/DMT. The F point was obtained with H₂O–ACN–THF (69.5:17.5:13, v/v/v) and 16 CAS were separated in about 26 min and coeluted DM/FM and DF/DMT. The G point was obtained with H₂O–MeOH–ACN–THF (60.6:19:11.7:8.7, v/v/v/v) and 15 CAS were separated in about 29 min and coeluted PS/FL/CS and MPL/BM.

The retention factors, k , obtained for each compound using the (A–G) mobile phases, the number of separated compounds, n , and run time analysis, t_{tot} , are summarized in Table 2. The range of CVs ($n=3$) of the retention factors for these compounds were lower than 1%.

Selectivity between solutes was examined qualitatively for the binary mobile phases by plotting $\ln k$ versus ϕ . Selectivity decreases as ϕ increases (some lines tend to converge) for the pairs DF or NE/NT using MeOH; DM/BM, DHEA/MT and DF/NT using ACN, and FL/CL using THF. However, for the pairs DMT/DF or NE using MeOH; FM/DM, BM/MPL, DMT/NT using ACN, and B/FL using THF, the behavior is the opposite (some lines tend to diverge). No significant modification in selectivity was observed for the majority of pairs (parallel lines). Likewise, to study selectivity between binary, ternary and quaternary mobile phases adequate plots of retention factors ($\ln k$) versus given mobile compositions can also be used. In this way, useful information can be obtained from Table 2 data by comparing selected mobile phases (e.g. only binary or ternary or even binary versus ternary or quaternary).

Reversals in the elution order were not observed for a solvent given in the range of concentrations used. However, some reversals were observed when compare optimized A–G mobile phases (e.g. for CS, FL, MPL, DF, NE and DHEA when compare MeOH and ACN, and PL, CS, FM, B, DM, and DMT when compare ACN and THF). Additional information can also be drawn from the data presented in Table 2.

To describe the resolution of the overall separation, the function of resolution, r , for the optimal separations was evaluated using the equation [34].

$$r = \prod_{i=1}^{n-1} \frac{S_{i,i+1}}{\sum (S_{i,i+1}/n-1)^{n-1}}$$

because of the number of compounds involved. $S_{i,i+1} = (k_{i+1} - k_i)/(k_{i+1} + k_i + 2)$ is the separation factor, and k_i and k_{i+1} ($k_{i+1} > k_i$) are the retention factors of two neighbouring peaks. In Table 2 are the r -values obtained. As can be observed, F and B mobile phases provided the separation of 16 out of 18 CAS in 26 and 32 min, respectively. However, resolution was 0.51×10^{-2}

Table 2
Retention factors, k , for the optimal separations of CAS using A–G mobile phases^a

Group	CAS	A	B	C	D	E	F	G
I CC	TRI	0.41	0.38	0.66	0.53	0.40	0.52	0.44
	PL	1.39	1.24	2.35	2.03	1.36	1.68	1.92
	PS	1.87	1.33	1.91	2.52	1.87	1.44	1.38
	CL	1.87	1.33	2.58	2.52	1.76	1.79	1.52
	FL	1.75	1.45	3.15	2.52	1.96	2.02	1.92
	CS	1.29	1.45	2.15	2.22	1.87	1.58	1.92
II CC + AAS	MPL	3.34	2.15	3.93	4.69	2.87	2.86	3.29
	BM	3.03	2.43	4.62	4.69	2.87	3.16	3.29
	DM	3.03	2.55	5.00	4.69	3.25	3.35	3.50
	FM	4.00	2.81	4.62	5.44	3.65	3.35	3.79
	B	4.25	4.14	3.70	6.13	3.01	3.56	3.65
	DF	4.92	5.11	5.00	9.15	3.95	4.46	4.93
	NT	4.61	4.72	5.00	6.79	3.46	4.14	4.22
	DMT	5.16	5.40	4.62	7.87	3.65	4.46	4.63
III AAS	NE	4.92	7.35	8.32	8.54	4.81	7.00	6.14
	MT	8.47	8.93	8.32	12.86	6.28	7.42	7.75
	DHEA	8.02	9.82	10.58	12.87	7.37	8.80	8.64
	BLS	10.62	11.93	11.23	16.80	8.28	9.92	10.28
	n	15	16	13	13	15	16	15
	$r \cdot 10^2$	0.72	0.93	1.77	1.82	0.61	0.51	0.68
	t_{tot} (min)	29	32	30	45	24	26	29

n is the number of separated compounds, r is the function of resolution and t_{tot} is the run time analysis.

^a A–G mobile phases (v/v/v). A: H₂O–MeOH (43:57); B: H₂O–ACN (65:35); C: H₂O–THF (74:26); D: H₂O–MeOH–ACN (54:28.5:17.5); E: H₂O–MeOH–THF (58.5:28.5:13); F: H₂O–ACN–THF (69.5:17.5:13, v/v/v) and G: H₂O–MeOH–ACN–THF (60.6:19:11.7:8.7).

for F and 0.93×10^{-2} for B. Finally, B mobile phase was selected for further experiments.

3.3. Relationships between retention, hydrophobicity and structure

In k_w and Φ_0 parameters have been proposed as a measure of hydrophobicity for a fixed mobile phase composition [35]. The extrapolated $\ln k_w$ is calculated from the commented plots $\ln k$ for each compound versus organic modifier, and their values are mainly due to the activity of residual silanols and other non-partitioning retention mechanisms with alkyl-bonded stationary phases. The chromatographic hydrophobicity index, Φ_0 , is defined as the volume percentage of organic solvent in the mobile phase producing a retention factor of unity. Their values are obtained from the intercept and the slope of the plots above described: $\Phi_0 = \ln k_w / S$.

Retention scale ($\ln k$) for a fixed mobile phase composition (e.g. triangle vertices) is plotted versus hydrophobicity measurements ($\ln k_w$ or Φ_0). From $\ln k$ versus $\ln k_w$ plots, good correlations for MeOH and ACN (Fig. 1) ($r=0.970$ and 0.985 , respectively) and poor for THF ($r=0.742$) were obtained. From $\ln k$ versus Φ_0 plots good correlations for MeOH and ACN ($r=0.990$ and 0.994 , respectively) and poor for THF ($r=0.892$) were also obtained. The correlations of $\ln k$ versus Φ_0 were higher than $\ln k$ versus $\ln k_w$ correlations, probably due to the S parameter is correlated to hydrophobicity and to several physical-chemical properties. Thus, retention of neutral compounds as CAS depends mainly on hydrophobicity and, therefore, it can be correlated to their structures. The sub-

stituent nature at C₁₇ of the basic steroid structure contributes to enhanced hydrophobicity and retention. As an example, corticoids (with a $-\text{COCH}_2\text{OH}$ group in C₁₇) were less retained than anabolic steroids (without $-\text{COCH}_2\text{OH}$ in C₁₇). From this point of view, CAS were classified into three groups (Table 2). Group I includes less retained CC (TRI, PL, PS, CL, FL, CS) due mainly to the substituent in C₁₇ ($-\text{COCH}_2\text{OH}$). TRI is the less retained due to $-\text{F}$ atom in C₉, $-\text{OH}$ in C₁₆ and a double bond in C₁–C₂. Group II, includes CC + AAS (MPL, BM, DM, FM, B, DF, NT, DMT), having intermediate retention. DF is the most retained CC, due to oxazol and ester substituent in C₁₆–C₁₇ and C₂₁, respectively. AAS are more retained than CC in group II due to the absence of $-\text{COCH}_2\text{OH}$ in C₁₇. FM is the less retained AAS ($-\text{F}$ in C₉, $-\text{CH}_3$ in C₁₇ and $-\text{OH}$ in C₁₁). DMT is the most retained of the group due to $-\text{CH}_3$ in C₁₇ and a double bond in C₁–C₂. Group III (NE, MT, BLS, DHEA), includes only AAS (the most retained CAS). NE is the less retained due to ethynyl group ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) on C₁₇, and BLS the most retained.

3.4. Temperature effect

The effect of temperature on CAS retention was studied in the range 30–50 °C using ACN (65:35, v/v) as mobile phase and a HYP column. The k -values, n and t_{tot} for CAS at different temperatures are summarized in Table 3. As can be observed, as temperature increases retention remains constant for less retained CAS (e.g. TRI, PL, PS and CL) and decreases slightly for the rest of CAS. Selectivity does not significantly change in the range 30–46 °C (16 out of 18 CAS are separated in about 30 min, coeluting PS/CL and FL/CS). However,

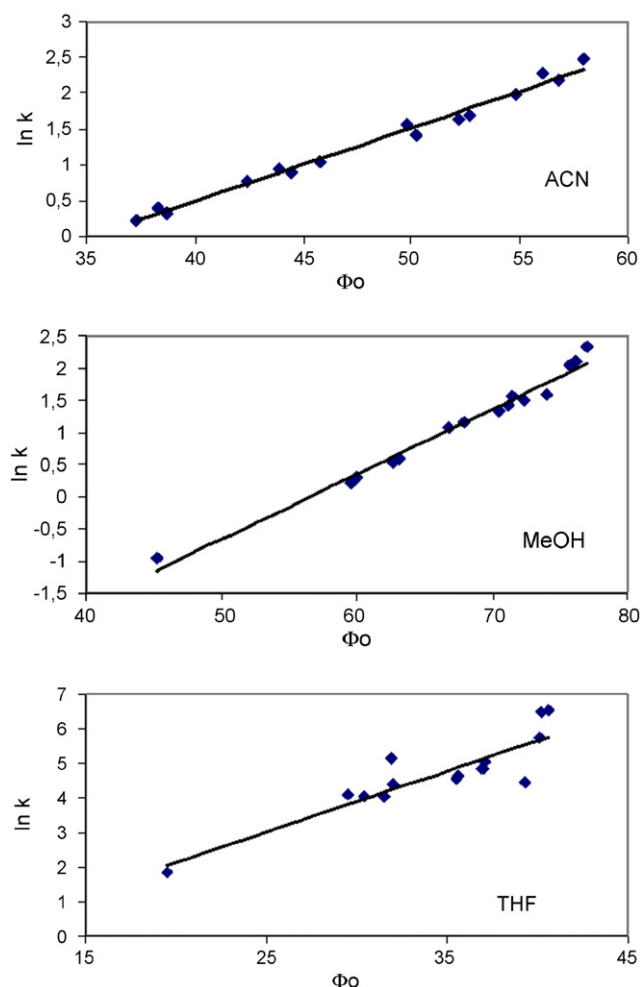


Fig. 1. Correlations between $\ln k$ and Φ_0 for CAS using A–C mobile phases. Conditions: Hypersil ODS column (30 °C) and $F = 1 \text{ ml min}^{-1}$.

at 50 °C, 15 out of 18 CAS are separated in about 28 min, coeluting PS/CL/FL/CS. These results indicate the robustness separation procedure in the range 30–46 °C. From these data, 30 °C was finally selected for further experiments. In Fig. 3A, the chromatogram obtained under these experimental conditions, is shown.

Van't Hoff plots ($\ln k$ versus $1/T$) were constructed with the data of Table 3 (exception is made for the less retained CAS: TRI, PL, PS, CL, MPL and FM because retention versus temperature does no change). The plots show a linear behaviour ($r > 0.99$). Enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) are derived from the slope and intercept, respectively. The negative enthalpy values obtained from the slopes (see Table 3) indicate that the mass transfer process is exothermic. Table 3 also lists the values for the term $\Delta S + R \ln \phi$, where ΔS are the entropy changes and ϕ the phase ratio (unknown value). The negative sign of the intercept (FL, CS, BM and DM) or positive (the remainder CAS) indicates that the entropy decreases or increases in the mass transfer process.

3.5. Stationary phase effect

In order to improve the separation achieved with the HYP column (30 °C) and water–ACN (65:35, v/v) as mobile phase, different reversed-phase packings such as Type-A [Lichrospher C8 (LIC8)] and Type-B alkyl–silica packings [Kromasil C18 (KR18), Luna C18 (LC18), Synergi C12 (SM12) and Purospher C18 (PUR)] were tested. The reasons for selecting these columns are mainly due to some of them have scarcely been used for complex mixtures of steroids [26,27,29]. Type-A LIC8 column was selected due to differences in hydrophobicity with regard to HYP column. KR18 has been selected due to the high efficiency silica particles, very high loading capacity, and excellent chemical and mechanical stability. LC18 and PUR columns were chosen due to their high efficiencies and bonded phase surface cov-

Table 3
Retention factors, k , for CAS obtained at different temperatures using water–acetonitrile (65:35, v/v) as mobile phase and a Hypersil column

CAS	30 °C	33 °C	36 °C	40 °C	43 °C	46 °C	50 °C	ΔH (kJ/mol)	$\Delta S + R \ln \Phi$ (J/kmol)
TRI	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	–	–
PL	1.19	1.20	1.19	1.19	1.18	1.19	1.19	–	–
PS	1.28	1.28	1.28	1.28	1.27	1.24	1.32	–	–
CL	1.28	1.28	1.28	1.28	1.27	1.24	1.32	–	–
FL	1.40	1.39	1.38	1.37	1.35	1.34	1.32	1.95	–3.62
CS	1.40	1.39	1.38	1.37	1.35	1.34	1.32	1.95	–3.62
MPL	2.06	2.06	2.06	2.05	2.02	2.03	1.99	–	–
BM	2.34	2.32	2.31	2.29	2.24	2.24	2.18	2.31	–0.54
DM	2.45	2.43	2.43	2.40	2.34	2.33	2.27	2.50	–0.76
FM	2.68	2.70	2.69	2.68	2.64	2.65	2.62	–	–
B	3.91	3.90	3.88	3.84	3.76	3.76	3.71	2.13	4.34
DF	4.80	4.81	4.79	4.74	4.64	4.66	4.55	1.90	6.85
NT	4.48	4.46	4.43	4.37	4.27	4.26	4.21	2.65	3.73
DMT	5.09	5.09	5.06	5.00	4.91	4.93	4.87	1.86	7.42
NE	7.00	6.91	6.85	6.70	6.51	6.43	6.17	4.21	2.30
MT	8.40	8.37	8.31	8.18	8.00	7.98	7.87	2.74	8.64
DHEA	9.18	9.10	9.07	8.80	8.54	8.44	8.30	4.37	4.06
BLS	11.22	11.17	11.09	10.87	10.65	10.62	10.43	3.00	10.2
n	16	16	16	16	16	16	15		
t_{tot} (min)	30	30	30	29	29	28	28		

ΔH are the enthalpy values and $\Delta S + R \ln \Phi$, are related to entropy (ΔS) of the process.

Table 4
Retention factors, k , obtained for CAS using different packings (30 °C)

CAS	HYP	LIC8	KR18	LC18	SM12	PUR
TRI	0.38	0.57	0.65	0.57	0.56	0.56
PL	1.24	1.53	2.15	1.82	1.61	1.62
PS	1.33	1.62	2.34	1.97	1.76	1.75
CL	1.33	1.62	2.34	1.97	1.76	1.75
FL	1.45	1.76	2.54	2.14	1.88	1.88
CS	1.45	1.76	2.54	2.14	1.96	1.88
MPL	2.15	2.38	3.74	3.11	2.64	2.66
BM	2.43	2.65	4.27	3.54	2.99	2.97
DM	2.55	2.77	4.50	3.72	3.16	3.11
FM	2.81	3.32	5.08	4.19	3.79	3.66
B	4.14	4.93	7.28	5.87	5.88	5.36
DF	5.11	5.13	8.48	6.79	6.34	5.95
NT	4.72	5.85	9.02	7.29	6.84	6.35
DMT	5.40	6.68	9.59	7.69	7.86	7.07
NE	7.35	8.41	13.53	10.95	10.36	9.47
MT	8.93	10.14	16.21	12.72	12.74	11.77
DHEA	9.82	10.45	17.34	13.52	13.39	12.4
BLS	11.93	13.0	21.71	16.94	16.94	15.23
n	16	16	15	16	17	16
$r \cdot 10^2$	0.93	0.58	0.69	0.66	0.40	0.94
t_{tot} (min)	32	29	45	40	41	38

For SM12 and PUR packings, 37% ACN as organic modifier was used and for the remainder ones 35% ACN.

erage, providing sharper peaks, and free silanols are virtually eliminated by complete bonding and endcapping. SM12 gives the hydrophobic retention and methylene selectivity expected from a C18 column (C12 ligand is sterically less hindered than a C18 and covers 25% more of the silica surface, shielding more free silanols) but with sharper peaks, less tailing, and excellent reproducibility [36].

Using 35% ACN, some columns afforded higher t_{tot} . For this reason, the ACN percent was slightly increased. Only SM12 and PUR columns give rise to the same n -values using 37% ACN without significant changes in selectivity. In Table 4, the k , n , r and t_{tot} values obtained under these conditions, are summarized. As can be observed, HYP column provides the separation of 16 out of 18 CAS in 32 min, coeluting PS/CL and FL/CS ($r = 0.93 \times 10^{-2}$). PUR, LC18, KR18 and LIC8 also separated 16 CAS with higher t_{tot} -values (with the exception of LIC18) and lower r -values (with the exception of PUR). SM12 provided the separation of 17 CAS in 41 min, coeluting PS/CL ($r = 0.40 \times 10^{-2}$). In k versus columns plots for CAS, under the above conditions, do not reveal important changes in selectiv-

ity from column to column. Only a change in elution order was observed for DF using HYP column (Table 4).

Based on column retention for 35% ACN, PUR, SM12 and KR18 (Type-B packings) were the most retentive for all compounds and the HYP and LIC8 (Type A) the less ones. Taking into account the selectivity parameters for the columns listed in Table 5 [37], retention can be explained by a combination of both H and S^* parameters, with a higher contribution of H parameter. The similarity in retention between HYP and LIC8 columns can be explained taking into account a lower steric hindrance and hydrophobicity for LIC8 column due to the short alkyl chain (C8). In the case of SM12 column, the high retention can be explained despite of its H -value because it is sterically less hindered than a C18 column and covers 25% more of the silica surface [37]. PUR and LC18 have the same H -value and retention can be explained by S^* -value.

From these results, the columns tested provide similar separations performance. As a consequence, they could be used for CAS separation. HYP column was selected as a compromise between n , r and t_{tot} .

3.6. Calibration graphs

Calibration graphs were obtained by adding to CAS-free feed samples, standards of CAS at five concentrations in the 0.10–2.0 mg/kg range using 1.0 mg/kg IS under solvent extraction conditions (Section 2.5.1). FL was used as IS for AAS (except for DHEA); FM for CL, BM, CS, MPL, TRI, PS and DF; and MPL for FL, PL, DM and DHEA. These mixtures were analyzed using a Hypersil ODS column, H₂O/ACN (65:35, v/v) as mobile phase, a flow-rate of 1.0 ml min⁻¹ and UV absorbance-DAD detection at 245 nm (DHEA was detected at 200 nm). The results were analyzed by linear regression. Plotting each steroid peak area to IS ratio (PAR) versus the concentration (x) of each one, the calibration equation $\text{PAR} = A + Bx$ (ng ml⁻¹) was obtained. In Table 6, the parameters A (intercept), B (slope) and r (regression coefficient) are summarized. The errors in the slopes and intercepts do not reveal significant differences. In all cases, the intercepts were not significantly different from zero.

3.7. Analysis of feed samples

Based on a previous sample preparation study for the analysis of trenbolone and other anabolics added to several feed samples,

Table 5
Selectivity parameters for several RP-LC columns^a

COLUMN	H	S^*	A	B	C (2.8)	C (7.0)	Type
Hypersil ODS	0.974	−0.027	−0.124	0.017	0.912	0.973	C18-A
Lichrospher RP-8	No available data						
Luna C18	1.003	0.023	−0.121	−0.006	−0.269	−0.173	C18-B
Kromasil C18	1.051	0.035	−0.069	−0.022	0.038	−0.057	C18-B
Synergi Max-RP	0.989	0.028	−0.008	−0.013	−0.133	−0.034	C12-B
Purospher STAR	1.003	0.013	−0.069	−0.035	0.018	0.044	C18-B

^a The column parameters measure the following column properties: H , hydrophobicity; S^* , steric resistance to insertion of bulky solute molecules into the stationary phase (conceptually similar to, but not the same as, “shape selectivity”); A , column hydrogen-bond acidity, mainly attributable to non-ionised silanols; B , column hydrogen-bond basicity; C , column cation-exchange activity due to ionized silanols (C will therefore vary with mobile phase pH).

Table 6

Linear regression equations ($PAR = A + Bx$) for CAS

STER	A	B	r	CC α ($\mu\text{g/kg}$)	CC β ($\mu\text{g/kg}$)	Repeatability (CV, %)			% R \pm CV
						1 CC α	1.5 CC α	2 CC α	
TRI	0.030	0.095	0.993	78	94	12.0	11.3	9.8	82 \pm 9
PL	0.055	0.180	0.998	55	69	14.8	13.4	11.7	79 \pm 6
PS	0.030	0.144	0.996	43	55	16.1	13.5	11.1	83 \pm 8
CL	0.031	0.173	0.997	45	53	10.7	12.0	10.1	85 \pm 8
FL	0.034	0.214	0.996	39	46	11.0	9.0	8.5	77 \pm 3
CS	0.025	0.178	0.995	44	52	11.4	11	9.7	89 \pm 3
MPL	0.023	0.157	0.995	40	47	10.5	9.7	8.0	79 \pm 7
BM	0.028	0.136	0.995	36	45	14.4	13.0	11.5	75 \pm 1
DM	0.029	0.155	0.997	42	49	9.5	8.1	7.2	88 \pm 3
FM	0.034	0.192	0.998	44	54	13.2	12.8	9.8	92 \pm 5
B	0.034	0.197	0.998	38	47	14.2	14.4	10.2	83 \pm 7
DF	0.044	0.122	0.995	38	46	13.3	12.7	10.8	90 \pm 8
NT	0.041	0.248	0.998	40	48	11.5	10.2	8.4	85 \pm 4
DMT	0.029	0.180	0.998	34	41	12.4	11.0	10.9	87 \pm 5
NE	0.003	0.218	0.999	36	44	13.9	11.8	10.5	70 \pm 6
MT	0.003	0.202	0.999	38	45	11.1	8.5	7.1	77 \pm 6
BLS	0.032	0.190	0.999	46	54	11.8	9.2	8.4	72 \pm 8
DHEA	0.064	0.117	0.995	198	249	17.8	14.1	10.0	70 \pm 7

PAR is the steroids peak area to internal standard (IS) ratio (see the IS used in text). Conditions: mobile phase (ACN/H₂O, 35:65, v/v), flow-rate 1 ml min⁻¹ and a HYP column. Repeatability (CV %) and recoveries (% R) for CAS added to piglets feed samples ($n=6$) were evaluated as indicated in Sections 3.7 and 2.5.2, respectively.

diethyleter (DEE), ethylacetate and dichloromethane were tested [38]. These solvents were used to select the most adequate for CAS analysis in piglet feed samples. From the results obtained, DEE was selected because provides only weak interferences at low retention times (corticoids window). To avoid interferences for low CC contents, a clean-up procedure is required. For this purpose, amino and diol alkyl–silica, and silica SPE cartridges were assayed. The most favorable results were obtained using Si cartridges described in Section 2.1. In Table 6 are shown the recoveries, % R, obtained for CAS added to feed samples for piglets following the procedure described in Section 2.5.2 and in Fig. 2A–C the chromatograms obtained from: a standard mixture of CAS (5.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (A), a blank (B) and a feed sample for piglets spiked with CAS (1.0 mg/kg) (C) following the procedure described in Section 2.5.1. The CVs ($n=6$) of the retention factors for CAS under Fig. 2 conditions was lower than 1% for each one.

In accordance with commission decision 2002/657/EC [7], decision limits (CC α) were evaluated by analyzing 20 blank feed samples and calculating the signal to noise ratios at the time window in which the analyte is expected. CC α were set as three times the signal to noise ratio (values in Table 6). In the same way, detection capabilities (CC β) were evaluated by analyzing 20 blank feed samples fortified with CAS at the decision limits. Once the analytes were identified, CC β were set as the value of the decision limit plus 1.64 times the standard deviation of the within-laboratory repeatability of the measured content (Table 6). Impurities were investigated further using a diode array detector by displaying the spectra obtained at different points across the peak and compared with those obtained with standards [39]. The possible impurities were not detected. The repeatability (within run precision) was examined by ana-

lyzing six different mixtures of CAS using feed samples spiked with CAS equivalent to 1, 1.5 and 2 times CC α concentrations and by running each mixture once ($n=18$). The CVs obtained are summarized in Table 6. The proposed method can only be used for screening purposes.

3.8. Conclusions

Different separations for CAS and, consequently, different selectivities were found using a HYP column (30 °C) and binary, ternary and quaternary mobile phases prepared with water and MeOH, ACN or THF. The optimum separation was achieved using a H₂O/ACN (65:35, v/v) as mobile phase. In this way, 16 out of 18 CAS were separated in about 30 min. The retention of CAS obtained with the optimal binary mobile phases was related with the hydrophobicity (using $\ln k_w$ and Φ_0 descriptors) and structure of these compounds. Using the optimum separation, different temperatures were studied showing few changes in selectivity. Other reversed-phase packings (Type-A and Type-B alkyl–silica) were tested showing separations with similar performance to HYP column.

The above separation conditions were applied to the analysis of spiked feed samples for piglets with screening purposes. In accordance with commission decision 2002/657/EC [7], the decision limits (CC α), detection capabilities (CC β) and repeatability for CAS, were examined. Besides, more specific applications could be derived from the separations obtained, by using different mobile phases and columns. The proposed sample preparation procedure could be considered as a starting point to analyze other kind of feed samples mainly due to their complexity, the plethora of registered ones in the world and the scarce literature about this topic, especially for complex mix-

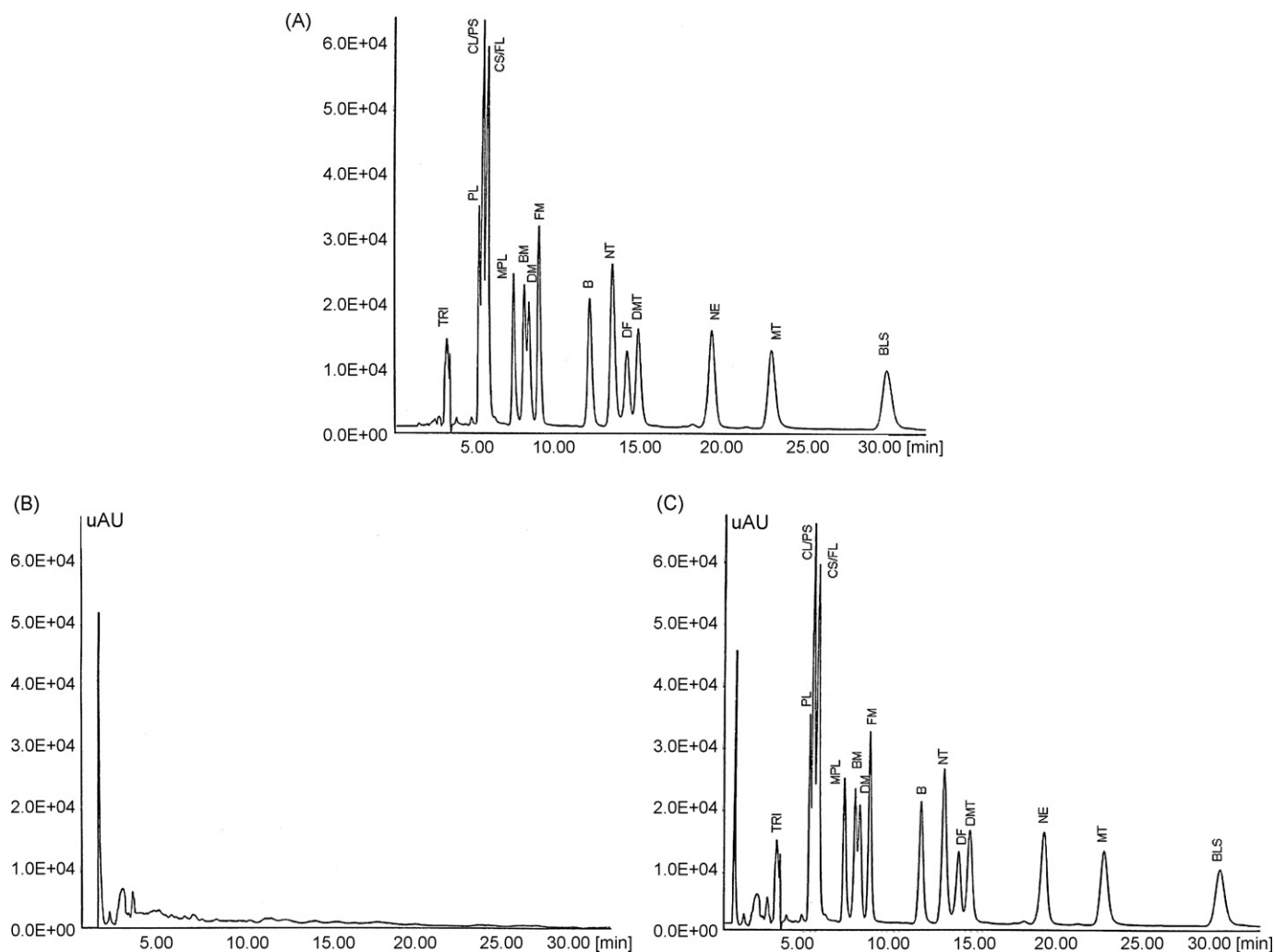


Fig. 2. Chromatograms obtained at 245 nm using a HYP column and a mobile phase water–ACN (65:35, v/v) for (A) a standard mixture of CAS ($5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$), (B) a blank feed sample and (C) a feed sample spiked with CAS (1.0 mg/kg) using the procedure described in Section 2.5.1. DHEA was monitored at 200 nm.

tures of CAS. For these reasons, our research is now addressed to improve the current results [11,28].

Acknowledgements

This work has been supported by Project (07G/047.1/2003 (Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid) (CM). R. Gonzalo-Lumbreras thanks CM for a post-doc grant associated to this project and the authors also thank A. Cubedo of Nutral for supplying feed samples.

References

- [1] L.K. Amundsen, J.T. Kokkonen, S. Rovio, H. Sirén, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 123.
- [2] V.A. Frericha, K.M. Tornatore, J. Chromatogr. B 802 (2004) 329.
- [3] S. Hartmann, H. Steinhart, J. Chromatogr. B 704 (1997) 105.
- [4] D. Courtheyn, B. Le Bizet, G. Brambilla, H.F. De Brabander, E. Cobbaert, M. Van de Wiele, J. Vercammen, K. De Wasch, Anal. Chim. Acta 473 (2002) 71.
- [5] C. Van Poucke, C. Van Peteghem, J. Chromatogr. B 772 (2002) 211.
- [6] Commission of the European Communities. Council Directive 96/23/EC. Off. J. Eur. Communities L125 (1996) 10.
- [7] Commission of the European Communities. Council Directive 2002/657/EC. Off. J. Eur. Communities L 221 (2002) 8.
- [8] Commission of the European Communities. Council Directive 2003/74/EC. Off. J. Eur. Communities L 262 (2003) 17.
- [9] Real Decreto 2178/2004. Ministerio de la Presidencia. Spain.
- [10] A. Lommen, R. Schilt, J. Weseman, A.H. Roos, J.W. van Velde, M.W.F. Nielsen, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 87.
- [11] A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, J. Chromatogr. B 824 (2005) 107.
- [12] K. Shimada, K. Mitamura, T. Higashi, J. Chromatogr. A 935 (2001) 141.
- [13] S. Görög, Anal. Sci. 20 (2004) 767.
- [14] M. Cherlet, S. De Baere, P. De Backer, J. Chromatogr. B 805 (2004) 57.
- [15] O. Van den Hauwe, F. Dumoulin, C. Elliott, C. Van Peteghem, J. Chromatogr. B 817 (2005) 215.
- [16] G. Balizs, A. Hewitt, Anal. Chim. Acta 492 (2003) 105.
- [17] G.N.W. Leung, E.W. Chung, E.N.M. Ho, W.H. Kwok, D.K.K. Leung, F.P.W. Tang, T.S.M. Wan, N.H. Yu, J. Chromatogr. B 825 (2005) 47–56.
- [18] M.J. O'Keefe, S. Martin, L. Regan, Anal. Chim. Acta 483 (2003) 341–350.
- [19] O. Van den Hauwe, F. Dumoulin, J.P. Antignat, M.P. Bouche, C. Elliot, C. Van Peteghem, Anal. Chim. Acta 473 (2002) 127–134.
- [20] A. Leinonen, T. Kuuranne, T. Kotiano, R. Kostianen, Steroids 69 (2004) 101–109.
- [21] N.H. Yu, E.N.M. Ho, D.K.K. Leung, T.S.M. Wan, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 1031.

- [22] C.L. Xu, X.G. Chu, C.F. Peng, Z.Y. Li, Y. Wang, J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 616.
- [23] R. Gatti, E. Cappellin, B. Zecchin, G. Antonelli, P. Spinella, F. Montero, E.F. De Palo, J. Chromatogr. B 829 (2005) 154.
- [24] I.G. Lange, A. Dextenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta, H.H.D. Meyer, Anal. Chim. Acta 473 (2002) 27.
- [25] A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, J. Chromatogr. B 721 (1999) 197.
- [26] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, J. Chromatogr. B 742 (2000) 1.
- [27] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, J. Chromatogr. B 742 (2000) 47.
- [28] M.W.F. Nielen, P. Rutgers, E.O. van Bennekom, J.J.P. Lasaroms, J.A. van Rhijn, J. Chromatogr. B 801 (2004) 273.
- [29] A. Santos-Montes, A.I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, J. Chromatogr. B 620 (1993) 15.
- [30] V. Morris, J. Hughes, P. Marriot, J. Chromatogr. A 1008 (2003) 43.
- [31] L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.L. Kirkland, Practical HPLC Method Development, second ed., Wiley, NY, 1997.
- [32] M.G. Khaledi, J.K. Strasters, A.H. Rodgers, E.D. Breyer, Anal. Chem. 62 (1990) 130.
- [33] A.S. Kord, M.G. Khaledi, J. Chromatogr. 631 (1993) 125.
- [34] J.R. Torres-Lapasió, R.M. Villanueva Camaño, J.M. Sanchos-Mallols, M.J. Medina-Hernandez, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Chromatogr. A 677 (1994) 239.
- [35] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, M.C. García-Alvarez-Coque, A. Berthod, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 279.
- [36] Phenomenex catalog for chromatographic columns and supplies, Torrance, CA, USA, 2005-6.
- [37] R. Snyder, J.W. Dolan, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1060 (2004) 77.
- [38] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, Unpublished work.
- [39] B.K. Logan, Anal. Chim. Acta 288 (1994) 111.

III.2

Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso usando una columna monolítica

Enviado a Analytica Chimica Acta (10-julio-2007)

Actualmente bajo revisión. N° registro ACA-07-1355

III.2.1. Introducción

Desde los años 70s, se han desarrollado métodos para la detección de esteroides (e.g. EAA) como agentes promotores de crecimiento en varias matrices de origen animal, tales como carne, grasa, tejido, orina, pelo. Con independencia de la matriz, su determinación no es una tarea fácil debido a que algunos son fuertemente metabolizados y sus metabolitos podrían ser desconocidos o sus estándares no ser comerciales [1]. Alternativamente, se ha propuesto en algunos países al pienso como matriz para el control de esteroides orales. Esta matriz es suficientemente compleja debido a que contienen gran cantidad de proteínas, carbohidratos y grasas [2].

Tradicionalmente, para la separación de mezclas complejas de esteroides se han utilizado columnas de partículas (principalmente C₁₈) con buenos resultados [3,4]. Sin embargo, los análisis rutinarios requieren alta resolución y separaciones rápidas. Las columnas monolíticas son materiales altamente porosos que permiten usar flujos de hasta 9 mL/min y, por tanto, separaciones más rápidas que las obtenidas con columnas de partículas [5,6].

Los procedimientos de preparación de muestra para la extracción de esteroides han sido dirigidos principalmente a muestras de orina, incluyendo extracción líquido-líquido (ELL) y/o extracción en fase sólida (EFS) con cartuchos C₁₈ [7]. Sin embargo, para el análisis de EAA en piensos se han reportado muy pocos métodos [8]. Así, usando LC se ha determinado boldenona en muestras de pienso para terneros mediante ELL con acetato:MeOH, EFS (C₁₈ y -NH₂), fraccionamiento con LC en una columna C₁₈ y detección mediante MS [9]. También se ha determinado metiltestosterona en pienso para peces mediante ELL con Hex:MeOH:H₂O, EFS (polimérico) utilizando detección UV y MS [10]. Las concentraciones esperadas en pienso son usualmente mayores que en tejidos animales. En este sentido, los métodos a desarrollar deben de permitir su detección a niveles de 1-10 mg/kg [8].

El presente trabajo consistió en el desarrollo y validación de un método mediante cromatografía de líquidos para la determinación de 7 EAA en muestras de pienso para cerdos usando una columna Chromolith RP-18e, detección UV-DAD a 245nm y epitestosterona como patrón interno. El desarrollo del método incluyó el estudio de fases móviles binarias acuosas de MeOH o ACN, flujo y temperatura. La separación óptima se consiguió utilizando ACN:H₂O (29:71, v/v), un flujo de 3 mL/min y 40 °C, respectivamente, separándose los EAA a línea base en un tiempo de análisis cercano a 15 min. El tratamiento de muestra incluye lixiviación con ACN, saponificación y EFS con cartuchos poliméricos Nexus. La validación del método se llevo a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por la UE para métodos criba cuantitativos tales como selectividad, linealidad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, exactitud [11]. Finalmente, el método se aplicó a nueve tipos de pienso para distintos animales obteniéndose resultados satisfactorios.

Referencias

- [1] D. Courthéyn, B. Le Bizet, G. Brambilla, H.F. De Brabander, E. Cobbaert, M. Van De Wiele, J. Vercammen, K. De Wasch, **Anal. Chim. Acta**, 473 (2002) 71.
- [2] O. Huetos, M. Ramos, M. Martín de Pozuelo, M. San Andrés, T.B.A. Reuvers, **Analyst**, 124 (1999) 1523.
- [3] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 742 (2000) 1.
- [4] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 742 (2000) 47.
- [5] McCalley, D.V., **J. Chromatogr. A**, 965 (2002) 51.
- [6] Bidlingmaier, B., Unger, K.K., Von Doehren, N., **J. Chromatogr. A**, 832 (1999) 11.
- [7] R. Gonzalo-Lumbreras, D. Pimentel-Trapero, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 754 (2001) 419.
- [8] A.A.M. Stolke, U. A Th. Brinkman, **J. Chromatogr. A**, 1067 (2005) 15.
- [9] M.W.F. Nielen, P. Rutgers, E.O. Van Bennekom, J.J.P. Lasaroms, J.A. Van Rhijn, **J. Chromatogr. B**, 801 (2004) 273.
- [10] A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. B**, 721 (1999) 197.
- [11] Commission of EC. Council Directive 2002/657/EC. **Off. J. Eur. Communities**, L221 (2002) 8.

LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD DEVELOPMENT FOR ANABOLIC STEROIDS USING A MONOLITHIC COLUMN. APPLICATION TO ANIMAL FEED SAMPLES

R. Muñiz-Valencia¹, R. Gonzalo-Lumbreras¹, A. Santos-Montes², R. Izquierdo-Hornillos^{1*}.

¹ Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

² Departamento de Ingeniería Mecánica. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad Pontificia Comillas. Alberto Aguilera 25, 28015 Madrid, Spain.

Abstract

An isocratic HPLC method for the determination with screening purposes of anabolic androgenic steroids (AASs: fluoxymesterone, boldenone, nortestosterone, metandrostenolone, norethindrone, methyltestosterone and bolasterone), used as growth promoting agents, in finishing pig feed samples has been developed and validated. The separation was achieved by using a reversed-phase Chromolith RP-18e column at controlled temperature, UV detection at 245 nm and epitestosterone as internal standard. The method development involved optimization of different aqueous-organic mobile phases using methanol or acetonitrile as organic modifiers, flow-rate and temperature. The optimum separation for these compounds was achieved at 40 °C using water:acetonitrile (71:29, v/v) as mobile phase and 3 mL min⁻¹ flow-rate, allowing the separation of AASs with baseline resolution in about 15 minutes. The optimized method was applied to the analysis of AASs in finishing pig feed samples. Prior to HPLC, sample preparation procedure was used by leaching using acetonitrile, saponification in a basic medium and solid-phase extraction using polymeric Absolut Nexus cartridges. Method validation has been carried out according to the European Commission Decision 2002/657/EC. The extraction efficiencies, decision limits (CC α) and detection capabilities (CC β) for these compounds were in the range 83-96%, 27-37 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 32-47 $\mu\text{g kg}^{-1}$ range, respectively. The within-laboratory reproducibility at 1, 1.5 and 2 CC β concentration levels were smaller than 13, 10 and 8%, respectively. Finally, the proposed method was successfully applied to nine different kinds of animal feed.

Keywords: anabolic androgenic steroids; growth promoting agents; animal feed; monolith column.

1. Introduction

Anabolic androgenic steroids (AASs) are characterized by their activity as growth promoting agents, because they increase the weight gain and reduce the feed conversion ratio. In addition, they have synergetic effects, reduce nitrogen retention and increase the water retention and fat content [1]. The administering of AASs to farm animals destined for human consumption has been deemed forbidden in the European Union (Directive 96/22/EC amended by Directive 2003/74/EC) [2,3].

Since the 70s, many analytical methods for the detection of illegal growth promoters, such as AASs, have been developed for a wide range of matrixes of animal origin, including meat, fat, tissues, urine, faeces and hair. AASs determination is not an easy task, e.g. some compounds are strongly metabolized and their metabolites might still unknown or their standards not available [1]. Moreover, to prevent possible consequences on animal welfare and consumer health, analytical strategies are needed to control the use of these compounds at any point in the animal feeding-stuff production chain (e.g. feed) [2]. Therefore, feed samples have also been proposed as alternative matrix to control steroids (compounds orally administered) in few countries [4].

Analysis of AASs in several matrixes is accomplished using GC-MS providing high sensitivity, specificity and chromatographic resolution. However, it requires a previous derivatisation step [5-8]. Many HPLC-MS methods have also been developed for measuring steroid hormones in urine [9-12] and animal tissue [13] samples. "The use of liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) for the determination of various analytes including AASs in veterinary drug residues has been reviewed [14]. HPLC-MS is a highly selective and sensitive technique for which derivatisation is often not required, thus reducing analysis times. HPLC-MS can also provide information on the chemical structure of the analytes and can be considered as a confirmatory method for steroids analysis. However, it has the disadvantage of being expensive and not available in all laboratories. HPLC-UV is a practical and cheaper technique [15] suitable for the screening and routine detection of AASs in urine and pharmaceuticals [16,17]. HPLC-UV and HPLC-MS has also been proposed for the analysis of AASs in feed samples [18,19].

Particulate columns, mainly C₁₈ columns, have been traditionally used for the separation of steroids in complex mixtures [16,17,20] with good results. However, routine analysis requires high-resolution and fast separations. The more recently manufactured monolithic columns are made via sol-gel technology which enables formation of highly porous material, containing macropores and mesopores in its structure [21]. The unique combination of very large internal surface area (mesopores 13 nm) together with significantly higher total porosity (2 μ m macropores) results in a reduction of the diffusion path and provides high permeability (and thus low pressure). This behaviour allows the use of flow-rates close to 9 mL min⁻¹ and enables faster separations than those obtained with standard columns [21,22]. In addition, their efficiency does not decrease significantly when the flow-rate is increased due to their flow-through pores, resulting in a reduction in mass transfer effects. Unlike monolithic columns, the efficiency of particulate columns decreases with flow-rate [23,24]. HPLC-MS using monolithic columns has been used for forensic drugs, including testosterone [25]. Capillary electrochromatography using macroporous monolithic columns has also been applied to neutral steroids separation [26].

Several matrixes have been tested for steroids residue analysis, mainly urine samples. The sample preparation procedures include liquid-liquid (LLE) or solid phase extraction (SPE) using C₁₈ cartridges [27]. However, few methods are available for feed sample analysis mainly due to its very complex (large contents in proteins and carbohydrates) and therefore it is not easy to extract the drugs [28]. Boldenone has been determined in feed samples for veal calves by a leaching process using an acetate buffered methanol solution followed by SPE employing C₁₈ and NH₂ cartridges and HPLC fractionation of the extracts on a C₁₈ column before HPLC-MS-MS analysis [18]. Methyltestosterone has been extracted from fish feed using LLE (hexane:MeOH-water), SPE using polymeric cartridges and subsequent HPLC [19]. An HPLC method for anabolics and corticoids in piglet feed samples including a leaching process using diethyl ether and SPE using silica cartridges has also been reported [20]. The drug concentrations in feed are usually much higher than in animal tissues. In this way, the methods to be developed for the analysis of AASs in feed should allow detection at levels as low as 1-10 mg kg⁻¹ [28].

In the present paper, an isocratic HPLC method for the determination of a complex mixture of AASs (structures in Table 1 [20]) in finishing pig feed samples using a Chromolith RP-18e column and UV detection has been developed and validated. The proposed method includes the study of binary mobile phases of water and methanol or acetonitrile as organic modifiers, flow-rate and temperature. In this way, the AASs were separated up to baseline in about 15 min using water:acetonitrile (71:29, v/v) as mobile phase. Before the HPLC step, a sample preparation procedure was developed. After validation, the proposed method has been successfully applied to different kinds of feed samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Boldenone (B) (1,4-androstadien-17 β -ol-3-one), bolasterone (BLS) (17-hydroxy-7,17-dimethylandroster-4-en-3-one), epitestosterone (ET) (17 α -hydroxy-4-androsten-3-one), fluoxymesterone (FM) (9 α -fluoro-11 β ,17 β -dihydroxy-17-methyl-4-androsten-3-one), norethindrone (NE) (19-nor-17 α -ethinyl-4-androsten-17 β -ol-3-one), 19-nortestosterone (NT) (17 β -hydroxy-19-norandroster-4-en-3-one), metandrostenolone (DMT) (17 β -hydroxy-17 α -methyl-1,4-androstadien-3-one) and methyltestosterone (MT) (17-hydroxy-17-methylandroster-4-en-3-one) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A stock solution of these analytes (1000 μ g mL⁻¹) was prepared in methanol. A fresh standard containing either only one of the AASs or a mixture of the AASs was prepared daily by diluting the stock solution with methanol and used for different studies.

HPLC-grade methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) and ethyl acetate from Scharlab (Barcelona, Spain) and Milli-Q water from Millipore (Molsheim, France) were used. Nylon filters (0.45 μ m pore size) from Millipore (Bedford, MA, USA), Strata-X (3 ml and 200 mg polymeric sorbent) from Phenomenex (Torrance, CA, USA), Absolut Nexus (3 ml and 60 mg polymeric sorbent), C₁₈ Bond Elut (3 ml and 500 mg) and Si Bond Elut (3 ml and 500 mg) cartridges from Varian (Harbor City, CA, USA) were also used. Other used chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Apparatus

The chromatographic system consisted of a PU-2089-Plus solvent delivery system, an online degasser and a multiwavelength MD-1510 photodiode-array detector (DAD) covering the range 190-600 nm and was interfaced to an AMD computer for data acquisition using the Borwin PDA 1.5 software from Jasco Analítica (Madrid, Spain). A 6-port valve with a 20 μ L sample loop injector from Rheodyne (Cotati, CA, USA), a Jones-Chromatography block heated series 7960 for thermostating columns in the 30-70°C range from Seagate Technology (Scotts Valley, CA, USA), a Chromolith RP-18e (100 x 4.6 mm I.D.) column from Merk (Darmstadt, Germany), a vortex mixer Mixo-Tub-30 from Crison (Barcelona, Spain), a thermostat bath Ultrasons-H from Selecta (Barcelona, Spain) operating in the 30-75 °C range, and a Visiprep vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were also used.

2.3. Mobile phase and chromatographic analysis

Isocratic mobile phases were prepared daily by mixing Milli-Q water with ACN or MeOH at the required volume ratio by programming the pump. Before use, all solvents were filtered under vacuum through 0.45 μ m pore size nylon filters.

Once the column had been conditioned with the mobile phase, chromatograms were obtained at the programmed temperature. For optimization purposes based on the use of different mobile phases, a methanolic solution containing a single AAS or an appropriate mixture of them (5 μ g mL⁻¹) was injected (20 μ L). The flow-rate tested was in the 1-4.0 mL min⁻¹ range and UV absorbance-DAD detection in the 190-360 nm range. Peaks identification and peak purity of AASs were performed by comparison of their retention times and UV spectra with those of previously registered compounds. All AASs were monitored at 245 nm [20].

2.4. Sample preparation

2.4.1. For AASs analysis

Powdered animal feed for finishing pig was kindly supplied from Nutral [29] (Madrid, Spain) with the following composition in w/w units: humidity (11.0%), protein (16.6%), fat (3.3%), fiber (4.3%), starch (44.2%), Ca (0.69%) and P (0.50%).

The procedure is illustrated in Fig. 1. Briefly, one gram of feed was placed in a 10 mL stoppered centrifuge tube. The samples were spiked with a steroid standard mixture within the 0.04 -2 mg kg⁻¹ range and 1.0 mg kg⁻¹ ET (IS) and leached using ACN. The mixture was shaken and centrifuged at 3700 g. The acetonitrile phase was removed from the mixture, filtrated using 0.45 μ m pore size nylon filters, and evaporated to 0.5 mL at 40 °C under nitrogen sparge. Then, a pH=10 sodium hydroxide (at room temperature) was added to that solution and the samples were afterwards cleaned-up with polymeric Nexus cartridges that had previously been conditioned with MeOH and water. After washing the cartridges, the elution of AASs was performed using ethyl acetate. The eluate was evaporated to dryness at 40 °C under nitrogen sparge. The dried residue was dissolved using 200 μ L of MeOH and then 20 μ L of this solution were injected into the HPLC system.

Blank finishing pig feed samples were previously checked for AASs following the above procedure and the results indicate that the samples did not contain any AAS.

For real samples analysis only the IS (1.0 mg kg^{-1}) was spiked and the mixture was treated in the same way that the procedure above described.

2.4.2. For AASs extraction efficiencies

Blank samples were prepared following the procedure described above. Extraction efficiencies, % E, for AASs were assessed using the Chromolith column, 40°C , $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (71:29 v/v) as mobile phase, at 3 mL min^{-1} flow-rate and from two different calibration graphs [30]. The first calibration was obtained by adding standard solutions of AASs at the concentration levels of 0.5, 2.0, 4.0, 5.0, 8.0 and $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (equivalent to $0.1\text{--}2 \text{ mg kg}^{-1}$) including ET as IS ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), to the dried residues obtained from blank samples (matrix-matched calibration curve), and the slope, S_1 , were calculated for each compound. The second calibration graph was obtained from finishing feed samples spiked with AASs at the concentration levels of 0.04, 0.2, 0.4, 1.0, 1.6 and 2.0 mg kg^{-1} including ET as IS (1.0 mg kg^{-1}), before applying the above sample preparation procedure, and the corresponding slope, S_2 , was calculated for each compound. The % E were calculated using equation $E (\%) = (S_2/S_1) \times 100$. The % E values obtained for AASs were independent of the concentration range used.

3. Results and discussion

3.1. Method development

The influence of mobile phases composed of MeOH (40–44%) and ACN (26–31%) as organic modifiers on AASs separation using a Chromolith RP-18e (100 mm x 4.6 mm) column (30°C), at 3 mL min^{-1} flow-rate and UV detection at 245 nm has been studied. The retention factors, k , were obtained from the retention times of AASs and a KNO_3 solution. KNO_3 was separately used to determine the dead-time for the column. As expected, retention factors (expressed as $\ln k$) for these compounds decreased linearly as MeOH or ACN concentration was increased which is in agreement with the simplified equation: $\ln k = S \phi + \ln k_w$, where ϕ is the organic modifier concentration, and S and $\ln k_w$ (slope and intercept), are the solvent strength parameter and the retention factors in a purely aqueous mobile phase, respectively [31,32]. As expected, the S values for any AAS as obtained from the slopes of the straight lines generally follow the trend: slope ACN > slope MeOH [20].

As can be seen in Fig. 2, selectivity between solutes was qualitatively examined by plotting $\ln k$ versus ϕ . No significant modification in selectivity was observed for AASs (parallel lines) using MeOH or ACN. Moreover, the elution order was the same within the range of concentrations studied.

Resolution (R_s) of adjacent peaks, decreases as ϕ increases when using either MeOH or ACN but not in the same way. So, all AASs were separated using ACN in the range of the concentrations tested. However, using MeOH the number of compounds in the chromatogram (NSC), was 5 within the range tested (the pairs FM/B and DMT/NE coeluted). Taking into account NSC, R_s and analysis time data, an $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ mobile phase (29:71, v/v) was finally selected. Under these conditions, the AASs were separated in about 15 min. The asymmetry factors, A_s (calculated at 10% of the peak height) [33] were in

the 1.11-1.25 range and R_s (calculated with peak width at half-height) in the 1.91-6.38 range. Under the above optimum conditions, the flow-rate was varied within the 1-4 mL min⁻¹ range. A flow-rate of 3 mL min⁻¹ was finally selected because it afforded better repeatability than using 4 mL min⁻¹. Lower flow-rates increased the retention times without significant improvements for R_s and A_s . The effect of temperature on AASs retention was studied in the 30-45 °C range (temperatures above 45 °C are not recommended by manufacturers of the column) on the separation conditions previously optimized: H₂O:ACN (71:29, v/v) as mobile phase and 3 mL min⁻¹ flow-rate. Retention decreases slightly as temperature increases and upon casual inspection, the results appear to show no significant differences in selectivity and resolution. From this study, 40 °C was finally selected for further experiments as a compromise between the separation characteristics (the ranges of A_s and R_s were 1.01-1.18 and 2.0-6.5, respectively) and column life.

Column efficiency was also evaluated using the Dorsey-Foley equation, $N_{df} = 41.7[t_r/w_{0.1}]^2/[A_s+1.25]$, where N_{df} is the Dorsey-Foley efficiency, in terms of the asymmetry factor (A_s) calculated at 10% of the peak height; t_r , the retention time for a given compound and $w_{0.1}$, the width peak at 10% of the peak height [34]. This procedure has been proven as a reasonable way to estimate the true efficiency when dealing with asymmetric peaks. The N_{df} values obtained were in the 4000-5500 range. This values are in agreement with those found in the literature [35,36]. The Dorsey-Foley height equivalent to theoretical plate (H_{df}) *versus* flow-rate was also assessed and upon casual inspection, the results appear to show no significant loss in efficiency within the range of flow-rates tested. Fig. 3A shows the chromatogram obtained under optimal experimental conditions for a 5 µg mL⁻¹ AASs standard mixture.

Based on this separation, the chromatographic performances obtained for separating these compounds were evaluated using the repeatability of peak areas (a) and retention times (t_r) as coefficient of variation (CV_a and CV_{t_r}) for six standard solutions containing 5 µg mL⁻¹ of each AAS. The CV_a and CV_{t_r} obtained were lower than 1%. In summary, these results indicate that the separation is adequate enough to develop an analytical method.

3.2. Calibration graphs and precision

Epitestosterone (ET) was selected as an internal standard (IS) for quantitation purposes because it is not orally administered. This compound eluted between MT and BLS and was separated up to baseline. Standard solutions containing methanolic mixtures of AASs were prepared at the concentration levels of 0.5, 2.0, 4.0, 5.0, 8.0 and 10.0 µg mL⁻¹ range using 5 µg mL⁻¹ ET as IS. These mixtures were analyzed at 40 °C using H₂O:ACN (71:29, v/v) as mobile phase, a flow-rate of 3 mL min⁻¹ and UV-absorbance detection at 245 nm. The results were analyzed by linear regression. Plotting each AAS peak area to IS ratio (y) *versus* the concentration ($x = \mu\text{g mL}^{-1}$) of each one, the calibration equation $y = A+Bx$ was obtained. The parameters A (intercept), B (slope) and r (regression coefficient) are summarized in Table 2. Upon casual inspection, the errors in the slopes and intercepts appear to show no significant differences. In all cases, upon casual inspection, the intercepts were not significantly different from zero.

The repeatability using concentrations was examined by analyzing different mixtures of AASs ($n = 6$) within a day using an individual concentration of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and by running each mixture once, whereas within-laboratory reproducibility using concentrations was evaluated for three different days ($n = 18$) using the calibration graphs. The CVs obtained are summarized in Table 2.

3.3. Optimization of sample preparation

Owing to the diversity and age of farm animals, a plethora of feeds with variable composition (commercially available and homemade) can be administered to farm animals. Feed is a very complex matrix containing mainly proteins, carbohydrates, fat and feed additives such as vitamins, antibiotics, minerals [28,29]. For these reasons, the analysis of steroids in feed samples is not an easy task. Thus, the above optimized separation was initially applied to the analysis of finishing pig feed samples spiked with AASs before sample preparation procedure. For this purpose, a reported sample preparation procedure for the analysis of AASs added to piglet feed samples was tested whereby diethyl ether was used for the leaching step of AASs from the matrix followed by SPE with silica (Si) cartridges for clean-up purposes [20]. This assay reveals that the chromatographic front width overlaps with two AASs. Consequently, other sample preparation procedures using ethyl acetate and ACN were performed for AASs leaching. The resulting samples indicated that ACN provides only weak interferences at low retention times. To avoid these interferences (probably due to the fat material observed along with extracted AASs) a clean-up procedure is required. Before using SPE the ACN extract was evaporated to 0.5 mL and then diluted with water to 6 mL. The use of different SPE cartridges such as C_{18} , and polymeric (Strata-X and Nexus) and ethyl acetate as eluent was not enough for clean up purposes because the extracts obtained from SPE were still oily and thus detrimental for the life of the chromatographic column. In order to eliminate the fat material that leached from the feed matrix, a basic saponification process prior SPE was applied with satisfactory results. In this way, using C_{18} , Strata-X and Nexus cartridges the results indicate that the chromatographic front width was thus reduced to two minutes in all cases yielding extraction efficiencies (% E) in the ranges of 70-100, 72-90 and 83-100, respectively. Nexus cartridges were finally selected based on % E values.

3.4. Method validation

The above optimized separation was applied to the analysis of finishing pig feed samples spiked with AASs before sample preparation (Section 2.4.1). The quantitative screening method validation has been carried out according to the European Commission Decision 2002/657/EC. For this purpose, eight mandatory performance characteristics for the conventional validation approach were determined: calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits, detection capabilities, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), accuracy, selectivity and robustness [37].

3.4.1. Calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits and detection capabilities

Similar calibrations to those described in Section 3.2 were carried out for AASs determination in finishing pig feed samples. It was performed by adding to AASs-free finishing feed samples, standards of

AASs at the concentration levels of 0.04, 0.2, 0.4, 1.0, 1.6 and 2.0 mg kg⁻¹ range using 1.0 mg kg⁻¹ ET (IS) and following the procedure described in Section 2.4.1. The resulting samples were analyzed under the conditions described in Section 3.2. Table 3 summarizes the data obtained by linear regression for these compounds (upon casual inspection, the results appear to show no significant differences of the errors in the slopes and intercepts).

Extraction efficiencies, % E, for AASs were assessed using calibration graphs according to the procedure described in Section 2.4.2. Table 3 shows the values obtained.

Decision limits (CC α) were evaluated by analyzing 20 blank finishing pig feed samples and calculating the signal to noise ratio at the time window in which the analyte is expected. CC α (α error = 1%) were set as three times the signal to noise ratio (values in Table 3). In the same way, detection capabilities (CC β) were evaluated by analyzing 20 blank finishing pig feed samples spiked with AASs at the decision limits. Once the analytes were identified, CC β (β error = 5%) was set as the value of the decision limit plus 1.64 times the standard deviation of the within-laboratory reproducibility of the measured content (Table 3).

3.4.2. Precision and accuracy

The repeatability was examined by analyzing six different feed samples spiked with AASs equivalent to 1, 1.5 and 2 times CC β concentration and by running each mixture once (n = 18), whereas within-laboratory reproducibility was evaluated for three different days (n = 54). The mean concentrations and CVs obtained are summarized in Table 4.

Accuracy was assessed by analyzing six different mixtures at three different concentration levels of AASs (1.0, 1.5 and 2.0 CC β) by replicate measurements (n = 18) [37]. Standards of AASs were added to finishing pig feed samples, processed according to sample preparation procedure (Section 2.4.1), analyzed using the proposed HPLC method and their concentrations calculated from calibration graphs described in Section 3.4.1. Table 4 shows the mean recoveries, % R, obtained for AASs.

3.4.3. Selectivity

Selectivity was assessed by a qualitative comparison of the chromatograms obtained from finishing pig feed and standard samples. Figs. 3A-C show the chromatograms obtained from: a standard mixture of AASs (5 μ g mL⁻¹) (A), a finishing pig feed blank (B) and a finishing pig feed sample spiked with AASs (1 mg kg⁻¹) (C), following the procedure described in Section 2.4.1. As can be seen, possible interferences due to the substances present in samples were not observed. In addition, a detection and identification process based on retention times and a diode array detector (DAD) was carried out [38]. The RSD (n = 6) of the retention times for AASs under Fig. 3 conditions were lower than 1% for each one. The UV spectrum of each peak in the chromatogram was stored and subsequently compared with that of the corresponding standard. The instrument can provide a contour plot, showing the relationship between absorbance, wavelength and time. This can be often be used for the detection of otherwise unsuspected impurities in the sample. Impurities were further investigated by displaying the spectra obtained at different points across the peak. The spectra were normalized and overlaid. If the peak is no chromatographically pure then the spectra will not match properly.

As impurities can present similar spectra to those of AASs, for investigating peak purity the second derivatives of the spectra and absorbance ratios (A_{275}/A_{245}) across the peak were also obtained. The chromatograms in Figs. 3B and C did not indicate signals originated from impurities. So, this procedure is adequate for analysis of AASs under study when applied to the study of finishing pig feed samples.

3.4.4. Robustness

Robustness was assessed by studying the effect of small deliberate changes of several operational method parameters such as injection volume, flow-rate, column temperature and operator. Finishing pig feed samples (1.0 mg kg^{-1}) were prepared and analyzed by two other operators (Nos. 2 and 3) by injecting six different samples ($n = 6$) using their own standards under different chromatographic conditions than those used in the present method (operator No. 1). As can be seen in Table 5, the working conditions used by the operator 2 were: 42°C , 2.7 mL min^{-1} and 242 nm , and by the operator 3: 38°C , 3.3 mL min^{-1} and 247 nm , for temperature, flow-rate and UV-detection, respectively. The results obtained are summarized in Table 5. As can be observed, these changes produced acceptable CV values (lower than 7.5%). To test whether the variation between the results of operators is significantly, an ANOVA test was performed. The calculated F-value was lower than the critical one. Thus, no significant differences between operators were found. Moreover, CV values are within the limits expected for the concentration levels present in these kinds of samples, and can be incorporated in the method procedure.

3.5. Application of the proposed method to other feeds

The proposed method was applied to other feed samples supplied by Nutral (Madrid, Spain). Table 6 shows the composition of feeds under study as well as their application. As can be seen in Fig. 4 the blanks obtained for these feeds are very similar to those obtained for the feed studied herein (Fig. 3B). This fact implies that the proposed method can be applicable to all feeds cited with exception to feed No. 21 (FM coeluted with the matrix). As an example, Fig. 5 shows a chromatogram for the feed No. 23 spiked with AASs.

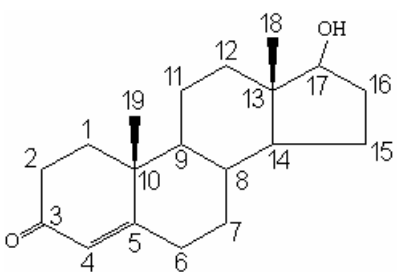
4. Conclusions

An HPLC method for the separation and determination of seven AASs in feed samples using monolithic packing has been developed. The optimal conditions using a recently manufactured Chromolith column were 40°C , $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (71:29, v/v) as mobile phase, UV-DAD detection at 245 nm and at 3 mL min^{-1} flow-rate. Under these conditions AASs were separated in 15 min with R_s and A_s values in the ranges of 2.0-6.5 and 1.01-1.18, respectively. The described method was further validated in finishing pig feed samples spiked with AASs, according to the European Commission Decision 2002/657/EC [37]. Eight mandatory performance characteristics (calibration curves, extraction efficiencies, decision limits, detection capabilities, accuracy, precision, robustness and selectivity) were determined for quantitative screening purposes. Prior to HPLC, an additional sample preparation step was required. The optimized sample treatment included a leaching process using ACN followed by saponification in a basic medium and clean up using polymeric Nexus cartridges, resulting in extracts clean enough for injection into an HPLC-DAD system. The proposed sample preparation procedure was successfully applied to nine different kinds of animal feeds.

Acknowledgements

This work has been supported by Project (07G/047.1/2003 (Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid) (CM). R. Gonzalo-Lumbreras thanks CM for a post-doc grant associated to this project, R. Muñoz-Valencia thanks CONACyT-México for a grant and the authors also thank A. Cubedo of Nutral (Madrid, Spain) for supplying feed samples.

Table 1. Structures of AAS.



AAS	C1-2	C7	C9	C11	C17	C19
Fluoxymesterone (FM)			-F	-OH	-CH ₃	
Boldenone (B)	=					
Nortestosterone (NT)						-H
Metandrostenolone (DMT)	=				-CH ₃	
Norethindrone (NE)					-C≡CH	-H
Methyltestosterone (MT)					-CH ₃	
Epitestosterone (ET)					α	
Bolasterone (BLS)		-CH ₃			-CH ₃	

Table 2. Linear regression equations ($y = A + Bx$), repeatability (RPT) and within-laboratory reproducibility (RPR) of concentration using standard mixtures.

AAS	A	B.10 ²	r	CV _{RPT} , %	CV _{RPR} , %
FM	-0.015	23	0.999	2.3	2.6
NT	-0.018	22	0.997	1.6	1.5
B	-0.020	26	0.998	2.0	2.1
NE	-0.017	22	0.999	1.6	2.3
DMT	-0.020	27	0.999	0.6	2.1
MT	-0.017	21	0.998	2.2	1.6
BLS	-0.024	30	0.999	2.2	2.0

Table 3. Linear regression equations, $y = A + Bx$ ($x = \text{mg kg}^{-1}$), using spiked finishing pig feed samples; decision limits ($\text{CC}\alpha$), detection capabilities ($\text{CC}\beta$) and extraction efficiencies ($\%E$).

AAS	A	$B \cdot 10^2$	r	$\text{CC}\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$\text{CC}\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$\% E \pm \text{CV}$
FM	-0.08	19	0.997	36	38	83 ± 4
NT	-0.014	20	0.997	37	45	91 ± 3
B	-0.022	25	0.997	31	37	96 ± 5
NE	-0.018	20	0.994	33	39	94 ± 5
DMT	-0.023	26	0.997	34	47	96 ± 2
MT	-0.012	20	0.997	29	34	92 ± 3
BLS	-0.008	25	0.998	27	32	84 ± 2

Table 4. Precision and accuracy using sample preparation at different concentration levels of AAS^a.

AAS	Repeatability						Within-laboratory reproducibility						Accuracy $\%R \pm \text{CV}$
	$\text{CC}\beta$	$\%CV$	$1.5\text{CC}\beta$	$\%CV$	$2\text{CC}\beta$	$\%CV$	$\text{CC}\beta$	$\%CV$	$1.5\text{CC}\beta$	$\%CV$	$2\text{CC}\beta$	$\%CV$	
FM	39	7.3	58	6.6	77	5.1	38	9.2	61	8.3	79	5.6	101 ± 6
NT	46	7.1	63	5.5	93	4.4	43	13.0	66	6.0	100	6.4	100 ± 8
B	37	9.9	55	4.5	74	4.8	39	10.4	56	7.7	70	5.9	99 ± 6
NE	38	9.2	58	5.4	80	4.9	36	11.0	56	8.5	78	7.1	100 ± 7
DMT	53	10.8	70	7.8	93	4.3	55	11.8	73	8.2	102	4.9	103 ± 8
MT	34	10.7	52	8.0	69	4.1	36	11.0	49	9.5	72	5.2	101 ± 8
BLS	32	4.8	47	5.6	64	3.7	31	7.3	48	6.2	67	4.3	99 ± 5

^a $\text{CC}\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Table 5. Chromatographic conditions and robustness test carried out by three operators ($n=6$)^a.

Operator	No. 1	No. 2	No. 3	
T ($^{\circ}\text{C}$)	40	42	38	
F (mL min^{-1})	3	2.7	3.3	
λ (nm)	245	242	247	
AAS	$\text{mg kg}^{-1} \pm \%CV$			Mean
FM	1.00 ± 3.9	0.98 ± 3.5	1.02 ± 2.4	1.00 ± 6
NT	1.02 ± 3.2	1.04 ± 4.8	0.96 ± 4.1	1.00 ± 4.8
B	1.04 ± 5.3	0.94 ± 4.1	0.98 ± 5.4	0.98 ± 5.1
NE	1.00 ± 4.9	0.94 ± 4.2	0.96 ± 4.2	0.96 ± 6.4
DMT	0.96 ± 2.2	0.92 ± 3.2	0.90 ± 2.7	0.92 ± 4.2
MT	0.98 ± 4.9	1.02 ± 5.7	1.00 ± 5.1	1.00 ± 7.2
BLS	0.96 ± 3.8	0.96 ± 2.3	0.92 ± 5.4	0.94 ± 4.4

^a T is temperature and F is flow-rate.

Table 6. Composition of feeds under study in % (w/w).

No.	Animal	Humidity	Protein	Fat	Fiber	Starch	Calcium	Phosphorus
4	Cow	10.9	16.5	2.6	7.9	33.9	0.97	0.54
6	Calf	11.6	14.6	2.7	7.2	39.6	0.97	0.47
9	Growing pig	10.9	16.4	2.8	4.4	43.4	0.90	0.51
10	Finishing pig	11.0	16.6	3.3	4.3	44.2	0.69	0.50
15	Laying hen	11.0	15.1	3.2	3.4	46.6	2.17	0.40
17	Poultry	11.1	17.0	3.8	3.9	42.7	1.02	0.55
21	Nursing calf	10.1	18.3	4.2	3.3	43.2	0.86	0.58
23	Nursing lamb	10.7	21.5	4.2	3.9	44.1	0.85	0.47

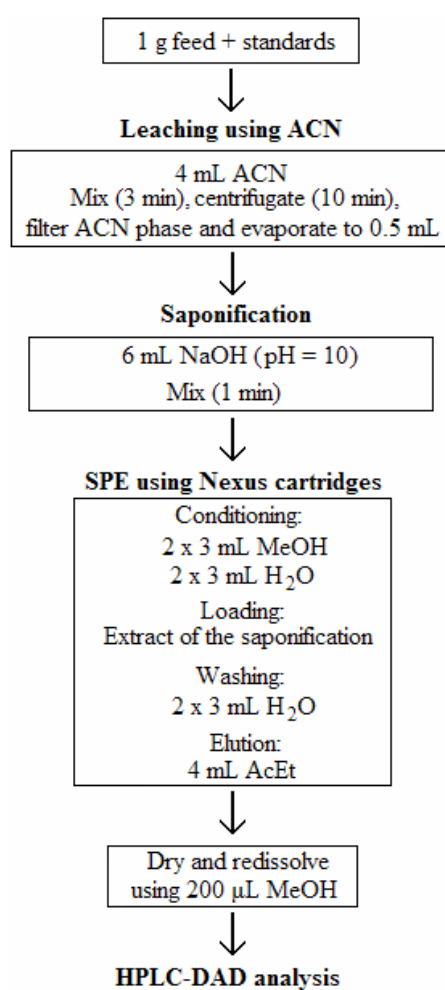


Fig 1. Scheme of the procedure used for feed samples preparation.

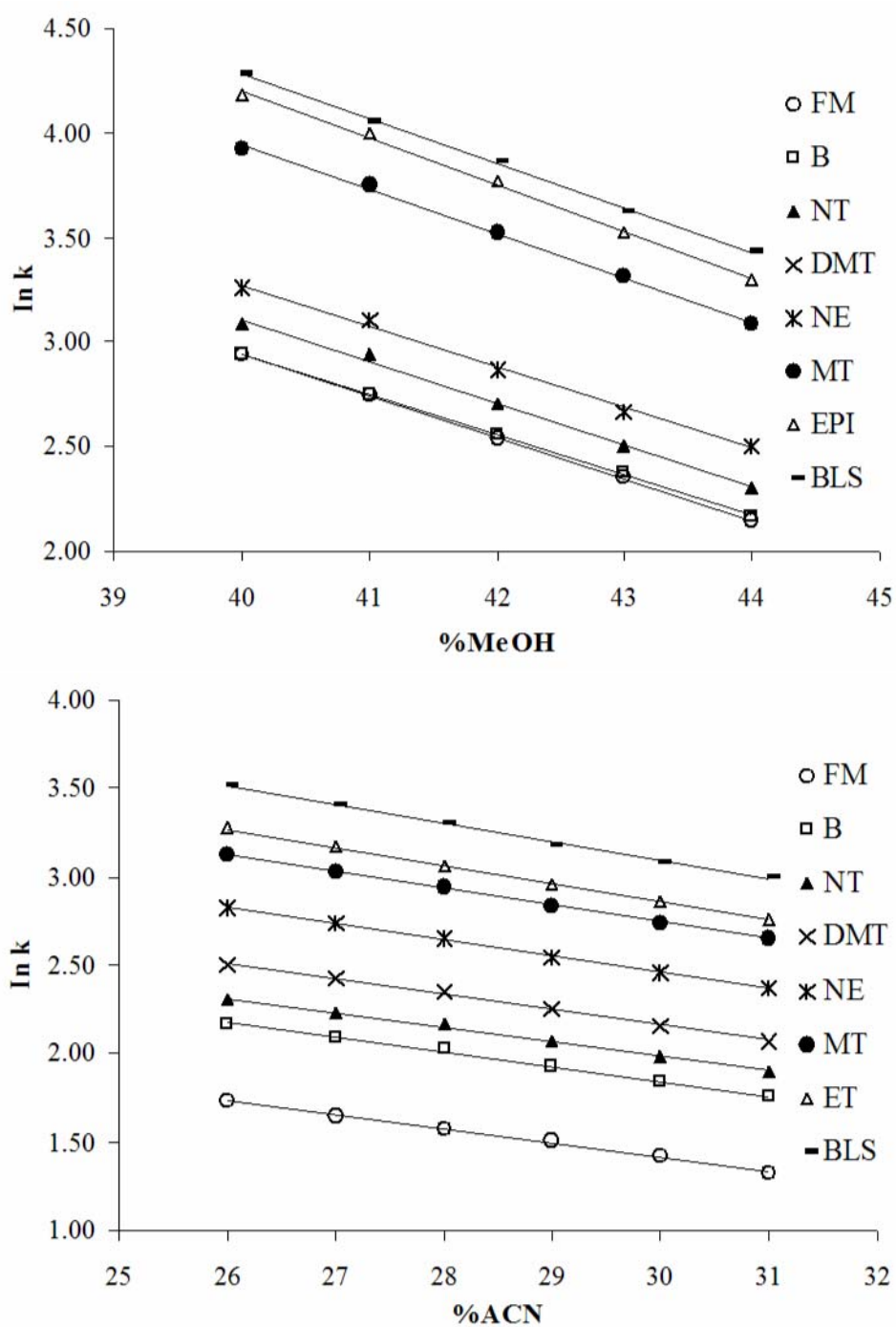


Fig. 2. Effect of different organic modifiers on AAS retention.

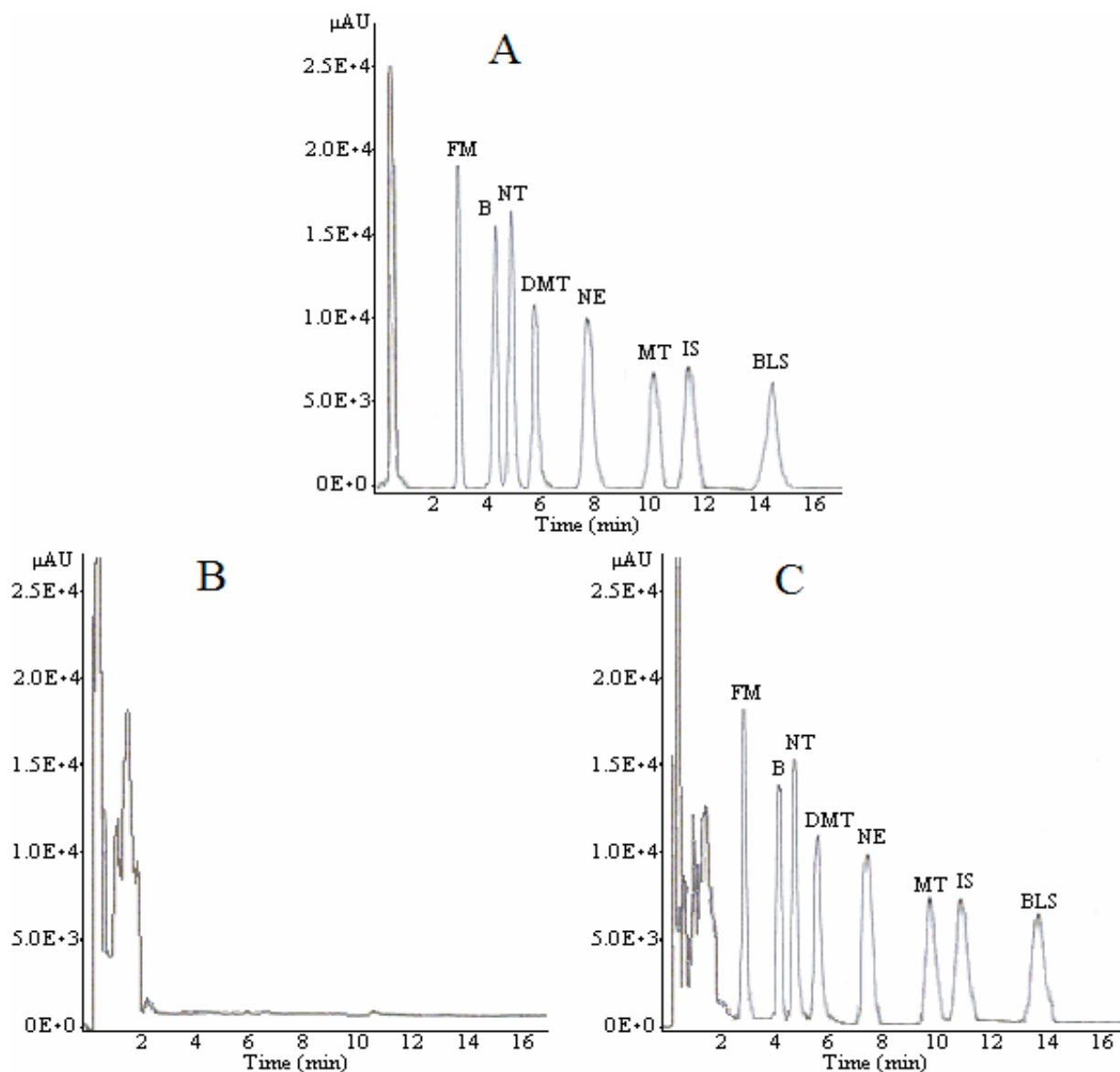


Fig. 3. Chromatograms obtained at 245 nm using a Chromolith column (40 °C), water:ACN (71:29, v/v) as mobile phase and 3.0 mL min⁻¹ flow-rate: (A) for a standard mixture of AASs (5 μg mL⁻¹), (B) for a finishing pig feed blank and (C) for a finishing pig feed sample spiked with AASs (1 mg kg⁻¹).

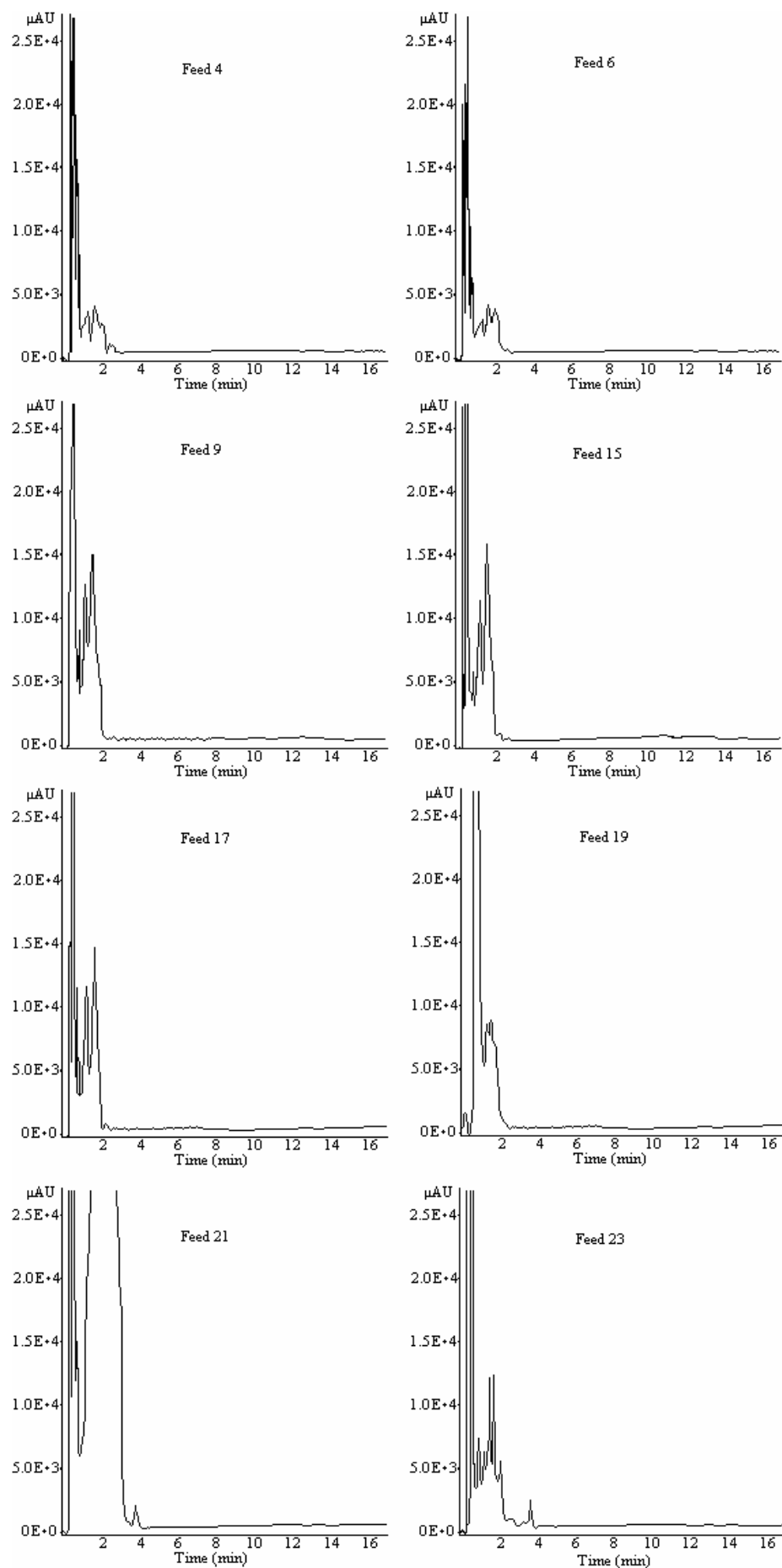
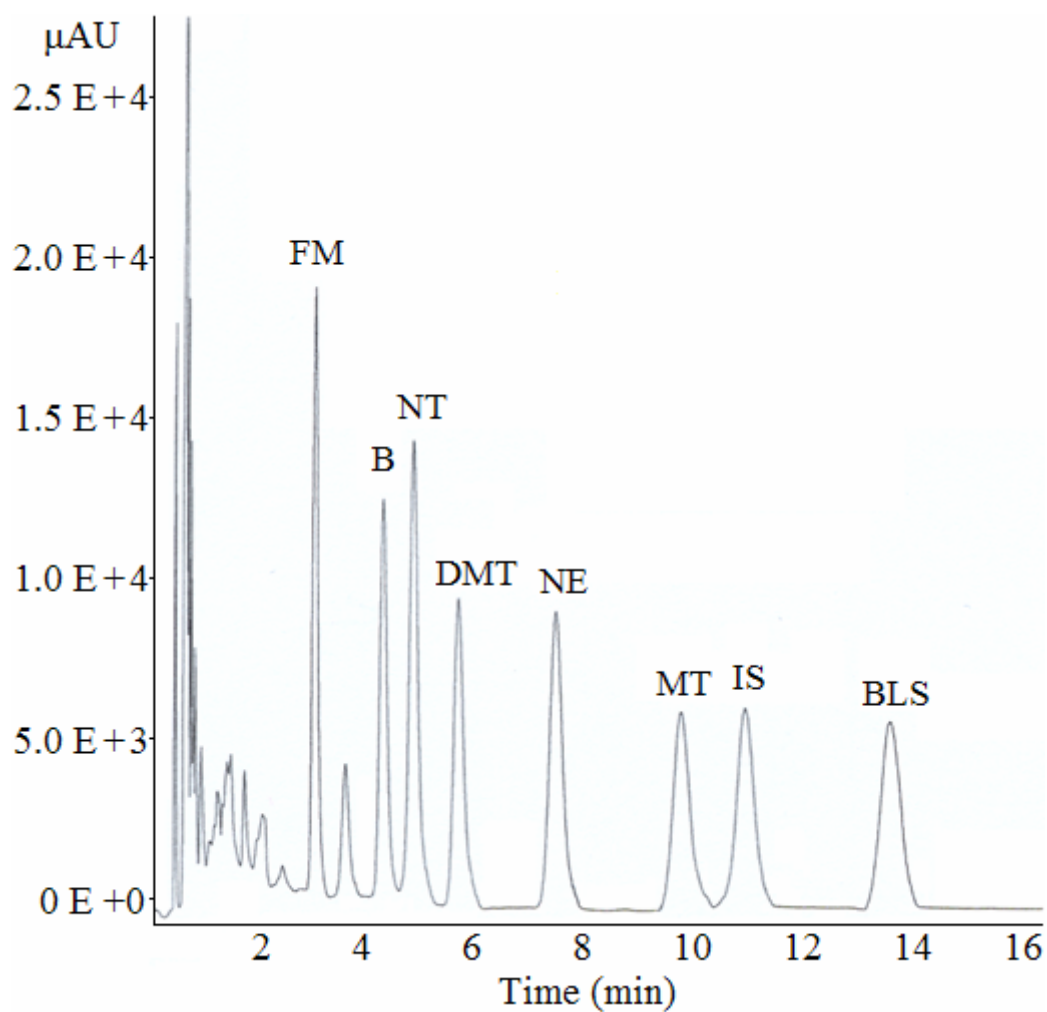


Fig. 4. Chromatograms obtained from different feed blank samples described in Table 6 and under the same conditions as in Fig. 3.



Chromatogram obtained from a spiked sample of feed No. 23 with AASs, described in Table 6 and in the same conditions as in Fig. 2.

References

- [1] D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla, H.F. De Brabander, E. Cobbaert, M. Van De Wiele, J. Vercammen, K. De Wasch, *Anal. Chim. Acta* 473 (2002) 71.
- [2] Commission of EC., *Off. J. Eur. Commun.* L125 (1996) 3.
- [3] Commission of EC., *Off. J. Eur. Commun.* L262 (2003) 17.
- [4] O. Huetos, M. Ramos, M. Martin de Pozuelo, M. San Andres, T.B.A. Reuvers, *Analyst* 124 (1999) 1523.
- [5] J. Marcos, X. de la Torre, J.C. González, J. Segura, J.A. Pascual, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 79.
- [6] E. Daeseleire, R. Vandeputte, C. Van Peteghem, *Analyst* 123 (1998) 2595.
- [7] Y. Gaillard, F. Vayssette, A. Ballant, G. Pépin, *J. Chromatogr. B* 735 (1999) 189.
- [8] V. Marcos, E. Perogordo, P. Espinosa, M. Martin de Pozuelo, H. Hooghuis, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 219.
- [9] M.J. O'Keeffe, S. Martin, L. Regan, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 341.
- [10] O. Van den Hauwe, F. Dumoulin, J.P. Antignan, M.P. Bouche, C. Elliot, C. Van Peteghem, *Anal. Chim. Acta* 473 (2002) 127.
- [11] S.A. Hewitt, M. Kearney, J.W. Currie, P.B. Young, D.G. Kennedy, *Anal. Chim. Acta* 473 (2002) 99.
- [12] C.L. Xu, X.G. Chu, C.F. Peng, Z.Y. Li, Y. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 616.
- [13] A. Leinonen, T. Kuuranne, T. Kotiano, R. Kostianen, *Steroids* 69 (2004) 101.
- [14] G. Balizs, A. Hewitt, *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) 105.
- [15] R. Gatti, E. Cappellin, B. Zecchin, G. Antonelli, P. Spinella, F. Montero, E.F. De Palo, *J. Chromatogr. B* 829 (2005) 154.
- [16] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, *J. Chromatogr. B* 742 (2000) 1.
- [17] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, *J. Chromatogr. B* 742 (2000) 47.
- [18] M.W.F. Nielen, P. Rutgers, E.O. Van Bennekom, J.J.P. Lasaroms, J.A. Van Rhijn, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 273.
- [19] A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, *J. Chromatogr. B* 721 (1999) 197.
- [20] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Muñoz-Valencia, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 321.
- [21] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanoshi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.* 73 (2001) 420A.
- [22] K. Sinz, K. Cabrera, *Environ. Technol.* 10 (2000) 36.
- [23] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 51.
- [24] B. Bidlingmaier, K.K. Unger, N. Von Doehren, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 11.
- [25] K. Pihlainen, E. Sippola, R. Kostianen, *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 93.
- [26] A.H. Que, A. Palm, A.G. Baker, M.V. Novotny, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 379.
- [27] R. Gonzalo-Lumbreras, D. Pimentel-Trapero, R. Izquierdo-Hornillos, *J. Chromatogr. B* 754 (2001) 419.
- [28] A.A.M. Stolke, U. A Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15.
- [29] www.nutral.com

- [30] A. Santos-Montes, R. Gonzalo-Lumbreras, A.I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, J. Chromatogr. B 652 (1994) 83.
- [31] M.G. Khaledi, J.K. Strasters, A.H. Rodgers, E.D. Breyer, Anal. Chem. 62 (1990) 130.
- [32] A.S. Kord, M.G. Khaledi, J. Chromatogr. 631 (1993) 125.
- [33] L.R. Snyder, J.L. Glajch and J.L. Kirkland, "Practical HPLC method development" Wiley and sons. Inc., NY (1997).
- [34] J.P. Foley, J.G. Dorsey, Anal. Chem. 55 (1983) 730.
- [35] F. Svec, C.G. Huber, Anal. Chem. 78 (2006) 2100.
- [36] M.M. Cledera-Castro, A.M. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, LCGC Europe 19 (2006) 424.
- [37] Commission of EC. Council Directive 2002/657/EC. Off. J. Eur. Communities L 221 (2002) 8.
- [38] B.K. Logan, Anal. Chim. Acta 288 (1994) 111.

III.3

Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de corticoides en pienso usando una columna monolítica

III.3.1. Introducción

Para prevenir las consecuencias negativas derivadas del uso de corticoides (CC) en el bienestar del animal y salud del consumidor, son necesarias estrategias analíticas para detectar su uso en cualquier punto de la cadena de producción de carne tales como pienso, agua, muestras biológicas [1]. Se han desarrollado métodos cromatográficos para la detección de CC en preparaciones acuosas y en matrices biológicas [2]. La técnica de GC tiene la desventaja de requerir la derivatización de la muestra, lo cual puede constituir una fuente de inexactitud y hace mas largo el tratamiento de muestra. En LC, los detectores UV y MS son los más usados. La detección por MS es sensible y da resultados fiables pero requiere altos costos operacionales y no esta disponible en todos los laboratorios.

Los análisis rutinarios de control requieren alta resolución y separaciones rápidas. Tradicionalmente, para las separaciones de CC se han utilizado principalmente columnas de partículas C₁₈. Recientemente se han ido introduciendo las columnas monolíticas debido a que son materiales altamente porosos que permiten usar flujos de hasta 9 mL/min y, por tanto, separaciones más rápidas que las obtenidas con columnas de partículas [3,4].

Los procedimientos de preparación de muestra para extraer CC de las matrices comunes incluyen extracción líquido-líquido (ELL) y/o extracción en fase sólida (EFS). Sin embargo, se han reportado muy pocos métodos para el análisis de pienso. Se ha determinado dexametasona en pienso y en agua mediante ELL con TBME y EFS (-NH₂ y de immunoafinidad) [5] y en pienso mediante ELL con DCM/Hex y EFS (SiOH y C₁₈) [6]. También, se han determinado varios CC en leche en polvo previo tratamiento de muestra utilizando EFS (C₁₈) [7]. Los métodos a desarrollar para pienso deben de permitir la detección a niveles de 100-500 µg/kg debido a que se ha comprobado que la adición de estas cantidades produce efectos promotores de crecimiento [8].

El presente trabajo consistió en el desarrollo y validación de un método mediante LC para la determinación de 7 CC en muestras de pienso para pollos usando una columna Chromolith con detección UV-DAD a 245 nm. El desarrollo del método incluyó el estudio de fases móviles binarias acuosas de MeOH o ACN, flujo y temperatura. La separación óptima se consiguió utilizando ACN:H₂O (21:79, v/v), flujo de 3 mL/min y 40 °C, respectivamente, separándose 4 de los 7 CC a línea base en un tiempo de análisis cercano a 10 min. Se utilizó un tratamiento de muestra previamente utilizado para extraer esteroides anabolizantes. Este incluye una lixiviación con ACN, saponificación y EFS con cartuchos poliméricos Nexus [9]. La validación del método se llevo a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por la UE para métodos criba cuantitativos tales como selectividad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, exactitud [10]. Por último, el método propuesto se aplicó a diferentes tipos de pienso para distintos animales obteniéndose resultados satisfactorios.

Referencias

- [1] Commission of EC. Council Directive 96/23/EC. **Off. J. Eur. Communities**, L125 (1996) 10.
- [2] Stolker, A.A.M., Brinkman, U.A.T., **J. Chromatogr. A**, 1067 (2005) 15.
- [3] McCalley, D.V., **J. Chromatogr. A**, 965 (2002) 51.
- [4] Bidlingmaier, B., Unger, K.K., Von Doehren, N., **J. Chromatogr. A**, 832 (1999) 11.
- [5] M. Reig, L. Mora, J. L. Navarro, F. Toldrá, **Meat Sci.**, 74 (2006) 676.
- [6] O. Huertos, M. Ramos, M. Martín de Pozuelo, M. San Andres, T.B.A. Reuvers, **Analyst**, 124 (1999) 1583.
- [7] M. Fiori, E. Pierdominici, F. Longo, G. Brambilla, **J. Chromatogr. A**, 807 (1998) 219.
- [8] A.A.M. Stolker, P.L.W.J. Schwillens, L.A. Van Ginkel, U.A.Th. Brinkman, **J. Chromatogr. A**, 893 (2000) 55.
- [9] R. Muñoz-Valencia, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, Enviado a: **Anal. Chim. Acta**.
- [10] Commission of EC. Council Directive 2002/657/EC. **Off. J. Eur. Communities**, L221 (2002) 8.

Roberto Muñoz-Valencia¹
Raquel Gonzalo-Lumbreras¹
Ana Santos-Montes²
Roberto Izquierdo-Hornillos¹

¹Departamento de Química
Analítica, Facultad de Ciencias
Químicas, Universidad
Complutense, Madrid, Spain

²Departamento de Ingeniería
Mecánica, Escuela Técnica
Superior de Ingeniería,
Universidad Pontificia Comillas,
Madrid, Spain

Original Paper

Method development validation for corticoids in animal feed samples by liquid chromatography using a monolithic column

A LC method for corticosteroids (CC) determination in poultry feed using a Chromolith column and UV detection has been developed and validated. The method development involved the optimization of different hydro-organic mobile phases using methanol or ACN as organic modifiers, flow rate, and temperature. The optimum separation was achieved at 40°C using ACN/water (21:79 v/v) as mobile phase and 3 mL/min flow rate, allowing the separation to baseline of four out of seven CC in about 10 min. Prior to LC, a sample preparation procedure previously assayed for anabolics was used. It includes a leaching process, saponification of the esters from fatty acids, and SPE. Method validation was carried out according to the EU criteria established for quantitative screening methods. The extraction efficiencies, decision limits (CC α), and detection capabilities (CC β) for these compounds were in the ranges of 86–92%, 27–36 $\mu\text{g/kg}$, and 33–43 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The repeatability and the within-laboratory reproducibility at 1, 1.5, and 2 CC β concentration levels were smaller than 9.0, 5.0, and 4.2% and 9.4, 6.4, and 4.9%, respectively. The CV values of the robustness test were less than 3.8% and the accuracy was in the range of 98–103%. The proposed method was applied to other feed with satisfactory results.

Keywords: Animal feed / Corticoids / Monolithic column

Received: July 17, 2007; revised: August 22, 2007; accepted: August 27, 2007

DOI 10.1002/jssc.200700322

1 Introduction

Corticosteroids (CC) are widely used to treat various inflammatory and immunologically mediated diseases both in human and veterinary medicine. They are also used as growth-promoting agents, improving feed intake and conversion, reducing nitrogen retention and increasing live weight gain, water retention, and fat content [1]. They have a synergetic effect with other illegal growth-promoting agents such as β -agonists or anabolic steroids [2]. Moreover, orally active CC can be administered through feed or animal feeding water [3, 4]. The use of CC in livestock breeding is banned within the EU [5]. However, the use of these compounds continues in order to produce meat that is more appealing to consumers because of its juicy and lean look. To prevent possible

consequences on animal welfare and consumer health, analytical strategies are needed to monitor the use of these compounds at any point in the animal feeding-stuff production chain (*e.g.*, feed, animal feeding water, and biological samples like meat and urine) [5].

The analytical methods applied to determine several compounds including steroids in food of animal origin have been reviewed [6, 7]. GC-MS methods have been used to control CC residues in biological samples [8, 9]. GC-negative chemical ionization-MS methods for the determination of dexamethasone (DM) in urine and feces of treated cattle [10] and for the detection of CC in aqueous preparations [11] have been proposed. GC-MS is a powerful technique, although usually the required derivatization step is time consuming and constitutes a source of inaccuracy.

Among the LC methods, the detection modes most commonly used are UV and MS. LC-MS methods for CC in bovine liver [12, 13], in animal urine [14, 15], in cattle tissue (kidney and muscle) and hair [16], in biological samples (hair, urine, and meat from bovine) [17], and in animal feeding milk [18] have been reported. LC-MS methods for CC and anabolic steroids in horse urine [19] have also been developed. A LC-TOF-MS method for CC in human

Correspondence: Dr. Roberto Izquierdo-Hornillos, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
E-mail: hornillo@quim.ucm.es
Fax: +34-91-3944329

Abbreviations: BM, betamethasone; CC, corticosteroids; CL, cortisol; CS, cortisone; DM, dexamethasone; MPL, methylprednisolone; PL, prednisolone; TRA, triamcinolone acetonide

and animal urine has also been reported [20]. Although, LC-MS technique is sensitive and can give reliable results, it requires high operating cost and is not available in all laboratories.

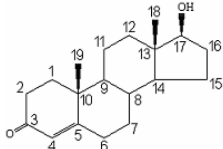
Several LC-UV methods for the detection of DM in animal biological samples [21–23], in feed and animal feeding water [24], and in feed [25] have been reported. LC-UV methods for CC in human samples [26], for anabolics and CC in piglet feed [27], and LC methods using UV and MS detection for CC in feed and bovine urine have also been reported [28].

Particulate columns, mainly C_{18} columns, have been traditionally used for the separation of CC mixtures. However, routine analysis requires high resolution and fast separations. Monolithic columns are highly porous materials, allow to use flow rates close to 9 mL/min and enable faster separations than those obtained with standard columns [29, 30]. In addition, the efficiency of monolithic columns does not decrease significantly when the flow rate is increased [31, 32]. Despite all these chromatographic performances, monolithic columns have been scarcely used for CC. A LC-UV method for the detection of triamcinolone, prednisolone (PL), and DM in tablets using a monolithic column has been reported [33]. However, the CC determination using monolithic columns in feed has not been found. On the other hand, the methods to be developed for the analysis of CC in feed should allow detection at levels as low as 100–500 $\mu\text{g/kg}$ because the addition of those low dosages has been shown to cause growth-promoting effects [28].

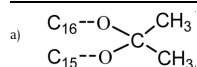
The sample preparation procedures for CC analysis in several kind of matrices include mainly liquid–liquid extraction (LLE) or SPE using C_{18} cartridges. However, few methods are available for feed analysis. DM has been determined in feed and animal feeding water including leaching using *tert*-butyl methyl ether and SPE cartridges ($-\text{NH}_2$ and immunoaffinity) [24] and in feed including leaching using dichloromethane/hexane and SPE cartridges (silica and C_{18}) [25]. Several CC have been identified in milk replacers using previously SPE cartridges (C_{18}) [18]. A LC method for anabolics and CC in piglet feed including leaching using diethylether and SPE cartridges (silica) has also been reported [27].

In the present paper, an isocratic LC method for the determination of CC (structures in Table 1) in poultry feed samples using a Chromolith column, UV-DAD detection, and a previously reported sample procedure which includes a leaching process using ACN, saponification of the esters from fatty acids, and SPE using polymeric cartridges (Muñiz-Valencia, R., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *Anal. Chim. Acta*, submitted), has been developed and validated. The method development included the study of binary mobile phases of water and methanol or ACN as organic modifiers, flow rate, and temperature. A mobile phase

Table 1. Structures of CC



CC	C1-2	C6	C9	C11	C16	C17
PL	=			–OH		–CO- CH ₂ OH
CL				–OH		–CO- CH ₂ OH
CS				=O		–CO- CH ₂ OH
MPL	=	–CH ₃		–OH		–CO- CH ₂ OH
BM	=		–F	–OH	–CH ₃ (β)	–CO- CH ₂ OH
DM	=		–F	–OH	–CH ₃ (α)	–CO- CH ₂ OH
TRA ^{a)}	=		–F	–OH		–CO- CH ₂ OH



ACN/water (21:79 v/v), 40°C and 3 mL/min flow rate allowed the CC separation up to baseline of four out of seven CC in an analysis time close to 10 min. After validation, the proposed method has been successfully applied to different kinds of feed samples.

2 Experimental

2.1 Chemicals

PL (11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), cortisol (CL) (11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione), cortisone (CS) (17 α ,21-dihydroxy-4-pregnene-3,11,20-trione), methylprednisolone (MPL) (6 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), betamethasone (BM) (9 α -fluoro-16 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), DM (9 α -fluoro-16 α -methyl-11 β ,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), and triamcinolone acetonide (TRA) (9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17,21-tetrahydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione-16 α ,17 α -acetonide) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A stock solution of these analytes (1000 $\mu\text{g/mL}$) was prepared in methanol. A single or a mixture of the CC was prepared daily by diluting the stock solution with methanol.

LC-grade methanol (MeOH), ACN, and ethyl acetate (AcEt) from Scharlab (Barcelona, Spain), NaOH from Merck (Darmstadt, Germany), Milli-Q water from Millipore (Molsheim, France), and Millipore 0.45 μm nylon filters from Bedford (MA, USA) were used. Absolut Nexus (3 mL and 60 mg polymeric sorbent) from Varian (CA, USA) was also used. Other used chemicals were of analytical reagent grade.

2.2 Apparatus

The chromatographic system consisted of a PU-2089-Plus solvent delivery system provided by an online degasser and a multiwavelength MD-1510 photodiode-array detector (DAD) from Jasco Analítica (Madrid, Spain) covering the range of 190–600 nm and interfaced to a computer for data acquisition. A 6-port Rheodyne valve with a 20 μ L sample loop injector from Cotati (CA, USA), a Jones-Chromatography block heated series 7960 for thermostating columns in the range of 30–70°C from Seagate Technology (Scotts Valley, CA, USA), a Chromolith RP-18e (100 \times 4.6 mm id) column from Merck (Barcelona, Spain), a vortex mixer Mixo-Tub-30 from Crison (Barcelona, Spain), a thermostated bath Ultrasons-H from Selecta (Barcelona, Spain) operating in the range of 30–75°C and a Visiprep vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were used.

2.3 Mobile phase and chromatographic analysis

Isocratic mobile phases were prepared daily by mixing Milli-Q water with ACN or MeOH at the required volume ratio by programming the pump. All solvents were firstly filtered under vacuum through 0.45 μ m nylon filters.

Once the column had been conditioned with the mobile phase, chromatograms were obtained at the programmed temperature. For optimization purposes based on the use of different mobile phases, a methanolic solution containing a single or an appropriate mixture of CC (5 μ g/mL) was injected (20 μ L). The flow rate was in the 1–4.0 mL/min range and UV absorbance-DAD detection in the 190–360 nm range. Peak identification and peak purity of CC were performed by comparison of their retention time and UV spectra with those of compounds previously registered by injection of each one individually. All CC were monitored at 245 nm.

2.4 Sample preparation

2.4.1 For CC analysis

Poultry feed was kindly supplied from Nutral (Madrid, Spain) with the following composition in w/w units: humidity (11.1%), protein (17.0%), fat (3.8%), fiber (3.9%), starch (42.7%), Ca (1.02%), and P (0.55%).

A developed extraction procedure for anabolic steroids in feed samples has been used (Muñoz-Valencia, R., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *Anal. Chim. Acta*, submitted). In summary, 1 g of feed was placed in a 10 mL stoppered centrifuge tube. The samples were spiked with a CC standard mixture within the 0.04–2 mg/kg range and 1.0 mg/kg MPL or TRA as internal standard (IS) and further leached using 4 mL of ACN. The mixture was shaken and centrifuged at 3700 \times g. The ACN phase was removed from the mixture,

filtrated using nylon filters, evaporated to 0.5 mL, added with 6 mL of NaOH solution (pH = 10) and processed through polymeric Nexus cartridges which had previously been conditioned with 2 \times 3 mL of MeOH and water. After washing the cartridges using water, the elution of CC was performed using 4 mL of AcEt. The eluate was evaporated to dryness at 40°C under nitrogen sparge. The dried residue was dissolved using 200 μ L of MeOH and 20 μ L was injected into the LC system. Blank poultry feed samples were previously checked for CC following the above procedure with negative results.

2.4.2 For CC extraction efficiencies

Blank samples were prepared following the procedure described above. Extraction efficiencies, %E, for CC were assessed using the Chromolith column (40°C), ACN/H₂O (21:79 v/v) as mobile phase, 3 mL/min flow rate and two different calibration graphs. The first calibration was obtained by adding standard solutions of CC at 0.5, 2.0, 4.0, 5.0, 8.0, and 10 μ g/mL (equivalent to 0.1–2 mg/kg in feed samples) to the dried residue obtained from blank samples, and the slope, S₁, was calculated for each compound. A second calibration graph was also obtained from poultry feed samples spiked with CC at 0.04, 0.2, 0.4, 1.0, 1.6, and 2 mg/kg after applying the above sample preparation procedure, and the corresponding slope, S₂, was calculated for each compound. The %E were calculated using equation $E(\%) = (S_2/S_1) \times 100$. The %E values obtained for CC were independent of the concentration range used.

3 Results and discussion

3.1 Method development

The influence of mobile phases composed of MeOH (27, 28, 29, 30, and 31% of MeOH) and ACN (18, 19, 20, 21, 22, and 24% of ACN) as organic modifiers on CC separation using a Chromolith column (40°C), 3 mL/min flow rate, and UV detection at 245 nm has been studied. The retention factors, *k*, were obtained from the retention times of CC and a KNO₃ solution. As expected, retention factors (ln *k*) for these compounds decreased linearly as MeOH or ACN concentration increased which are in agreement with the simplified retention equation: $\ln k = S\phi + \ln k_w$, where ϕ is the organic modifier concentration, and *S* and *k_w* (slope and intercept) are the solvent strength parameter and the retention factor for a given mobile phase in the absence of organic modifier, respectively. The *S* values for any CC obtained from the slopes of the straight lines follow the sequence: ACN > MeOH.

Selectivity between solutes was qualitatively examined by plotting ln *k* versus ϕ . No significant modification in selectivity was observed for CC (parallel lines) using

MeOH or ACN. Moreover, the elution order was the same within the range of concentrations studied.

Resolution (R_s) of adjacent peaks, decreased as ϕ increases either using MeOH or ACN but not in the same way. The number of peaks (n) observed in the chromatograms using ACN was 7 in the range of concentrations tested (PL, CL, and CS were not baseline resolved). In the case of MeOH, $n = 6$ within the range tested (PL/CL co-eluted). Taking into account n , R_s , and analysis time, a mobile phase ACN/H₂O (21:79 v/v) was finally selected. Under these conditions, CC were separated in about 10 min. The asymmetry factors, A_s (calculated at 10% of the peak height), were in the range of 0.95–1.10 and R_s (calculated with peak width at half-height) in the range of 0.5–8.1. The effect of flow rate was studied at 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0 mL/min. A flow rate of 3 mL/min was finally selected because it afforded better repeatability than using 4 mL/min. Lower flow rates increased the retention times without significant improvements for R_s and A_s . The effect of temperature on CC retention was studied at 30, 35, 40, and 45°C (temperatures above 45°C are not recommended by manufacturers) under the separation conditions previously optimized: ACN/H₂O (21:79 v/v) as mobile phase and 3 mL/min flow rate. Retention decreases slightly and selectivity is not affected significantly for all CC as temperature increases and $n = 7$ at any temperature. From these data, 40°C was finally selected (A_s and R_s were in the ranges of 0.94–1.02 and 0.6–8.3, respectively).

Column efficiency was also evaluated using the Dorsey–Foley equation, $N_{df} = 41.7[t_r/w_{0.1}]^2/[A_s + 1.25]$, where N_{df} is the Dorsey–Foley efficiency, in terms of the asymmetry factor (A_s) calculated at 10% of the peak height; t_r , the retention time for a given compound, and $w_{0.1}$, the width peak at 10% of the peak height [34]. This procedure has been proven as a reasonable way to estimate the true efficiency for asymmetric peaks. The N_{df} values obtained were in the 2500–5352 range. H_{df} versus flow rate was also assessed and no significant loss in efficiency was observed within the range of flow rates tested. Figure 1A shows the chromatogram obtained under optimal experimental conditions for a 5 µg/mL CC standard mixture.

Based on this separation, the repeatability as CV was estimated for six standard solutions containing 5 µg/mL of each CC using peak areas (CV_a) and t_r (CV_t). The CV_a and CV_t obtained were lower than 1%. In summary, the chromatographic performances obtained for separating these compounds were adequate enough to develop an analytical method.

3.2 Analysis of poultry feed samples and method validation

The above optimized separation was applied to the analysis of poultry feed samples spiked with CC after sample

preparation (Section 2.4.1). The quantitative screening method validation has been carried out according to the European Commission Decision 2002/657/EC. For this purpose, eight mandatory performance characteristics for the conventional validation approach were determined: calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits ($CC\alpha$), detection capabilities ($CC\beta$), precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), accuracy, selectivity, and robustness [35].

3.2.1 Calibration graphs, extraction efficiencies, $CC\alpha$, and $CC\beta$

Several CC were tested as IS. MPL and TRA were judged to be the best for quantitation purposes. MPL eluted between CS-BM and TRA after DM and were separated up to baseline. TRA was used as IS for CL and MPL and MPL for PL, CS, BM, DM, and TRA. It was performed by adding to CC-free poultry feed samples, standards of CC at six concentrations 0.04, 0.2, 0.4, 1.0, 1.6, and 2.0 mg/kg using 1.0 mg/kg MPL or TRA as IS, following the procedure described in Section 2.4.1. These mixtures were analyzed at 40°C using ACN/H₂O (21:79 v/v) as mobile phase, a flow rate of 3 mL/min, and UV-absorbance detection at 245 nm. The results were analyzed by linear regression. Plotting each CC peak area to IS ratio (PAR) versus the concentration (x) of each one, the calibration equation $PAR = A + Bx$ (mg/kg) was obtained. The parameters A (intercept), B (slope), and r (regression coefficient) are summarized in Table 2. In all cases, the intercepts were not significantly different from zero.

Table 2. Linear regression equations, $PAR = A + Bx$ (mg/kg), using spiked poultry feed samples; $CC\alpha$, $CC\beta$, and extraction efficiencies (%E)

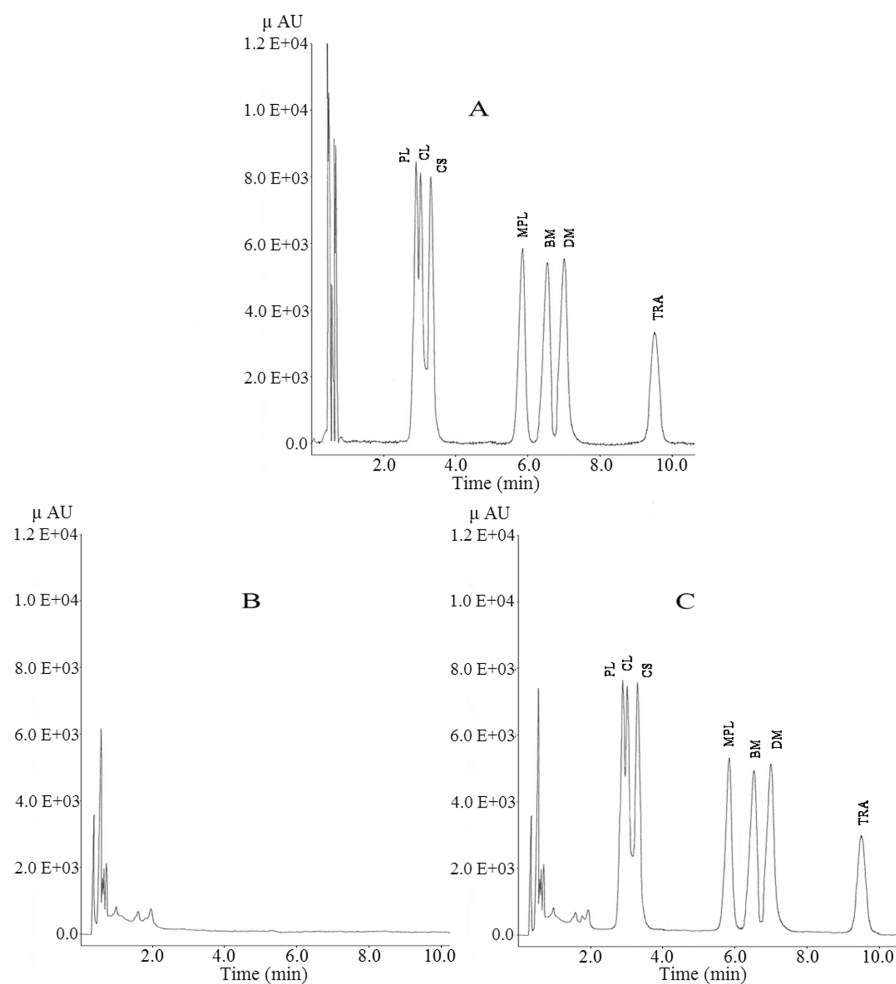
CC	A	$B \times 10^2$	r	$CC\alpha$ (µg/kg)	$CC\beta$ (µg/kg)	%E \pm CV
PL	−0.07	110	0.992	36	40	90 \pm 2
CL	−0.08	112	0.998	31	35	91 \pm 2
CS	−0.07	116	0.998	34	42	92 \pm 1
MPL	−0.09	100	0.999	29	39	86 \pm 3
BM	−0.03	84	0.993	27	40	90 \pm 4
DM	−0.06	88	0.996	27	33	91 \pm 2
TRA	−0.05	90	0.998	36	43	92 \pm 2

Extraction efficiencies, %E, for CC were assessed using calibration graphs according to the procedure described in Section 2.4.2. The values obtained are shown in Table 2.

Decision limit ($CC\alpha$) is defined as the limit at and above which it can be concluded with an error probability of α that a sample is noncompliant and detection capability ($CC\beta$) as the smallest content of the substance that may be detected, identified, and/or quantified in a sample with an error probability of β [35]. $CC\alpha$ were evaluated by analyzing 20 blank poultry feed samples and calculating

Table 3. Precision and accuracy using sample preparation at different concentration levels of CC

CC	Repeatability						Within-laboratory reproducibility						Accuracy %R \pm CV
	CC β	%CV	1.5 CC β	%CV	2 CC β	%CV	CC β	%CV	1.5 CC β	%CV	2 CC β	%CV	
PL	39	8.9	59	4.2	78	2.8	40	9.3	59	6.1	79	3.1	99 \pm 2
CL	33	7.6	51	4.5	69	2.9	34	9.3	53	6.1	70	3.4	100 \pm 4
CS	40	5.7	60	4.0	85	2.2	41	6.5	64	5.9	85	3.5	100 \pm 2
MPL	40	7.3	59	3.6	80	2.4	39	8.7	56	5.7	79	3.3	98 \pm 4
BM	42	7.7	57	3.5	81	2.2	41	9.0	60	5.2	83	4.7	103 \pm 4
DM	33	5.2	51	3.1	67	2.2	33	6.5	51	4.1	66	2.9	102 \pm 3
TRA	43	6.8	66	4.9	86	4.1	42	8.7	73	6.3	86	4.8	100 \pm 2

**Figure 1.** Chromatograms obtained at 245 nm using a Chromolith column (40°C), ACN/H₂O (21:79 v/v) as mobile phase, and 3.0 mL/min flow rate: (A) for a standard mixture of CC (5 μ g/mL), (B) for a poultry feed blank, and (C) for a poultry feed sample spiked with CC (1 mg/kg).

the S/N at the time window in which the analyte is expected. CC α (α error = 1%) were set as three times the S/N (values in Table 2). In the same way, CC β were evaluated by analyzing 20 blank poultry feed samples spiked with CC at the CC β . Once the analytes were identified, CC β (β error = 5%) was set as the value of the decision limit plus 1.64 times the SD of the 20 spiked blanks at CC β concentration (Table 2).

3.2.2 Precision and accuracy

The repeatability was examined by analyzing six different mixtures of CC using poultry feed samples spiked with CC equivalent to 1, 1.5, and 2 times CC β concentration and by running each mixture once ($n = 18$), whereas within-laboratory reproducibility was evaluated for three different days ($n = 54$). The mean concentrations and CVs obtained are summarized in Table 3.

Table 4. Chromatographic conditions and robustness test results obtained by three operators ($n = 6$)

Operator	No. 1		No. 2		No. 3		Mean	
T (°C)	40		42		38			
F (mL/min)	3		2.7		3.3			
λ (nm)	245		243		247			
CC	mg/kg	%CV	mg/kg	%CV	mg/kg	%CV	mg/kg	%CV
PL	1.00	1.58	1.01	3.37	1.01	3.02	1.01	3.50
CL	1.00	2.08	0.98	2.08	0.99	3.78	0.99	3.34
CS	1.02	2.65	0.99	2.02	1.01	2.24	1.00	2.75
MPL	0.99	2.32	0.98	2.91	0.97	2.97	0.98	2.93
BM	1.02	2.47	1.01	3.76	1.00	3.13	1.01	2.33
DM	1.01	2.21	0.98	2.90	0.99	3.24	0.99	3.50
TRA	1.02	2.27	0.99	3.35	1.01	3.14	1.01	3.77

Table 5. Composition of feeds under study in% w/w

No.	Animal	Humidity	Protein	Fat	Fiber	Starch	Calcium	Phosphorus
4	Cow	10.9	16.5	2.6	7.9	33.9	0.97	0.54
6	Calf	11.6	14.6	2.7	7.2	39.6	0.97	0.4
9	Growing pig	10.9	16.4	2.8	4.4	43.4	0.90	0.51
10	Finishing pig	11.0	16.6	3.3	4.3	44.2	0.69	0.50
15	Poultry	11.1	17.0	3.8	3.9	42.7	1.02	0.55
17	Laying hen	11.0	15.1	3.2	3.4	46.6	2.17	0.40
18	Piglet	10.2	19.8	6.3	2.2	43.8	0.66	0.56
21	Nursing calf	10.1	18.3	4.2	3.3	43.2	0.86	0.58
23	Nursing lamb	10.7	21.5	4.2	3.9	44.1	0.85	0.47

Accuracy was assessed by analyzing six different mixtures at three different concentration levels of CC (1.0, 1.5, and 2.0 CC β) by replicate measurements ($n = 18$). Standards of CC were added to poultry feed samples, processed according to sample preparation procedure (Section 2.4.1), and analyzed using the proposed LC method. Table 3 shows the amounts spiked and the mean accuracies, %R, obtained.

3.2.3 Selectivity

Selectivity was assessed by a qualitative comparison of the chromatograms obtained from poultry feed and standard samples. Figure 1A–C shows the chromatograms obtained from: a standard mixture of CC (5 μ g/mL) (A), and a poultry feed sample blank (B) and a poultry feed sample spiked with CC (1 mg/kg) (C) following the procedure described in Section 2.4.1. As can be seen, possible interferences due to the substances present in samples were not observed. In addition, a detection and identification process based on retention times and a DAD was carried out [36]. The retention times for PL, CL, CS, MPL, BM, DM, and TRA under Fig. 1 conditions were 2.92, 3.05, 3.34, 5.86, 6.54, 7.02, and 9.52 min and their RSD ($n = 6$) 0.7, 0.6, 0.8, 0.7, 0.7, 0.5, and 0.4%, respectively. The UV spectrum of each peak in the chromatogram was stored and subsequently compared with standards. The spectra were normalized and overlaid. Impurities were

investigated further by displaying the spectra obtained at different points across the peak with negative results. Figure 1B and C chromatograms indicate that this procedure is adequate for the analysis of CC under study in poultry feed samples with screening purposes.

3.2.4 Robustness

Robustness was assessed by studying the effect of small deliberate changes of several operational method parameters such as wavelength, flow rate, column temperature, and operator. Poultry feed samples (1.0 mg/kg) were prepared and analyzed by two other operators (nos. 2 and 3) ($n = 6$) using their own standards under different chromatographic conditions than those used in the present method (operator no. 1). The working conditions used and the results obtained for the operators are summarized in Table 4. As can be observed, these changes produced acceptable CV values (lower than 3.8%). These values are within the limits expected for the concentration levels present in these kinds of samples, and can be incorporated in the method procedure.

3.3 Application of the proposed method to other feeds

The proposed method was applied to other feed samples supplied by Nutral S. A. Table 5 shows the composition of feeds under study as well as their application. As can be

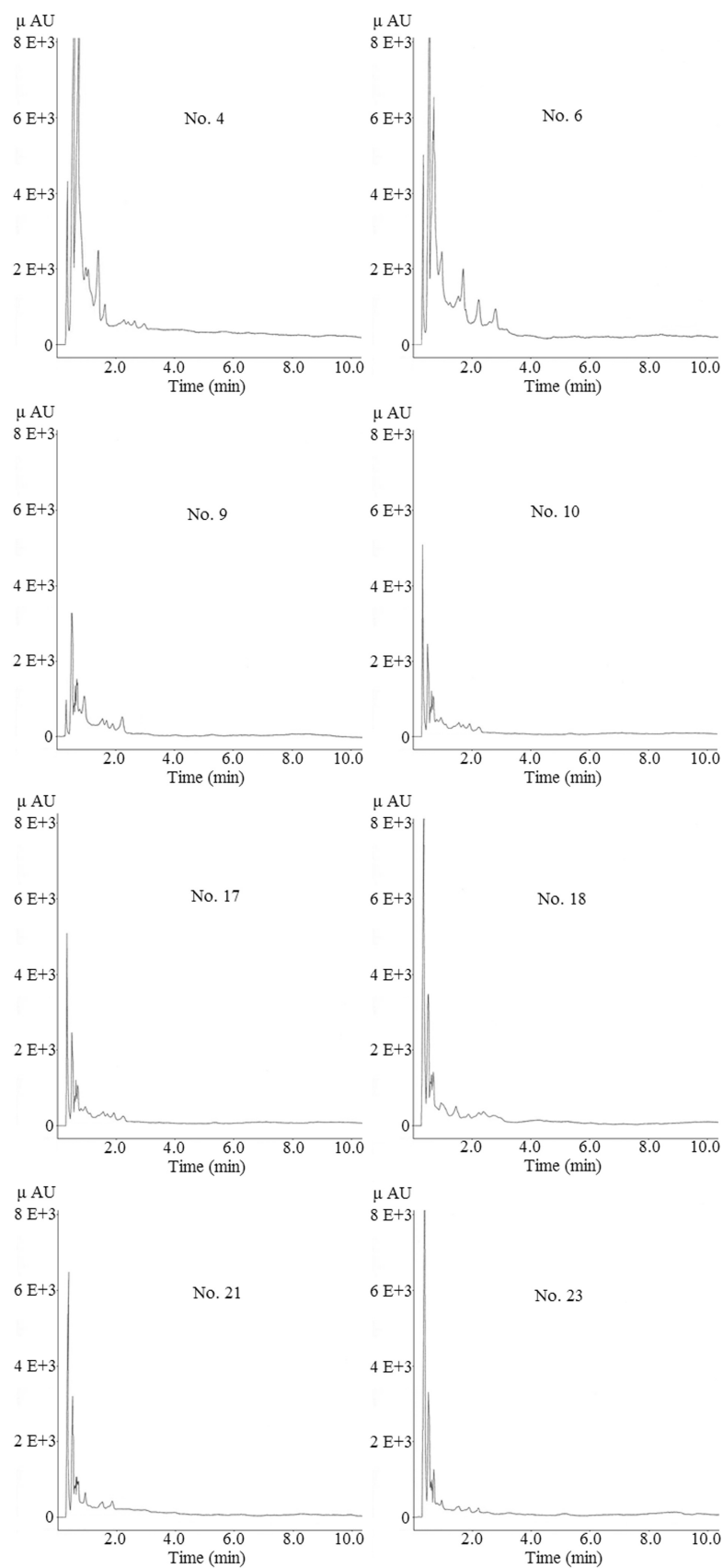


Figure 2. Chromatograms obtained from different feed blank samples (Table 5). Conditions as in Fig. 1.

seen in Fig. 2, the blanks obtained for these feeds are very similar to those obtained for the feed herein studied (Fig. 1B). Moreover, the CC were extracted from these spiked feed with similar %E values to those obtained for poultry feed. These facts imply that the proposed method can be applicable to the feeds cited and probably to many more. An exception was detected for PL in feed no. 6 because PL overlapped with an unknown peak of the matrix.

4 Concluding remarks

A LC method for the separation of seven CC using a monolithic column has been developed. The optimal conditions were 40°C, ACN/H₂O (21:79 v/v) as mobile phase, UV-DAD detection at 245 nm and 3 mL/min flow rate. Under these conditions, CC were separated in 10 min with R_s and A_s values in the ranges of 0.94–1.02 and 0.6–8.3, respectively. The described method was further validated in poultry feed samples spiked with CC, according to the European Commission Decision 2002/657/EC [35]. Eight mandatory performance characteristics (calibration curves, extraction efficiencies, CC α , CC β , accuracy, precision (repeatability, within-laboratory reproducibility), robustness, and selectivity) were determined for quantitative screening purposes. Prior to LC, a previously reported sample preparation procedure for anabolics steroids in feed was used (Muñiz-Valencia, R., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *Anal. Chim. Acta*, submitted). This procedure includes a leaching process using ACN followed by saponification of the esters from fatty acids and a clean up using polymeric Nexus cartridges. This sample treatment was found to be applicable to different kinds of animal feed. Additionally, this procedure can be applied successfully to the analysis for either anabolic steroids or CC in feed samples using the same monolithic column, the same temperature (40°C), and different compositions of the same organic modifier (ACN) employing short analysis time.

This work has been supported by Project (07G/047.1/2003 Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid, CM). R. Gonzalo-Lumbreras thanks CM for a post doc grant associated to this project, R. Muñiz-Valencia thanks CONACyT for a grant, and the authors also thank A. Cubedo of Nutral for supplying feed samples.

5 References

- [1] Courtheyn, D., Le Bizec, B., Brambilla, G., De Brabander, H. F., Cobbaert, E., Van de Wiele, M., Vercammen, J., De Wasch, K., *Anal. Chim. Acta* 2002, 473, 71–82.
- [2] Antignac, J. P., Le Bizec, B., Monteau, F., André, F., *Steroids* 2002, 67, 873–882.
- [3] O'Keeffe, M. J., Martin, S., Regan, L., *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 341–350.
- [4] Van Peteghem, C., Daeselaire, E., in: Nolle, L. M. L. (Ed.), *Handbook of Food Analysis*, 2nd Edn., Marcel Dekker Inc. N. Y. 2004, pp. 1037–1063.
- [5] Commission of EC, Council Directive 96/23/EC. *Off. J. Eur. Commun.* 1996, L125, 10.
- [6] Stolker, A. A. M., Brinkman, U. A. T., *J. Chromatogr. A* 2005, 1067, 15–53.
- [7] Balizs, G., Hewitt, A., *Anal. Chim. Acta* 2003, 492, 105–131.
- [8] Courtheyn, D., Vercammen, J., Logghe, M., Seghers, H., De Wasch, K., De Brabander, H., *Analyst* 1998, 123, 2409–2414.
- [9] Delahaut, Ph., Jacquemin, P., Colemonts, Y., Dubois, M., Graeve, J., De Deluyker, H., *J. Chromatogr. B* 1997, 696, 203–215.
- [10] Courtheyn, D., Vercammen, J., De Brabander, H., Vandenreyt, I., Batjoens, P., Vanoosthuyze, K., Van Peteghem, C., *Analyst* 1994, 119, 2557–2564.
- [11] Noppe, N., Verheyden, K., Gillis, W., Courtheyn, D., Vanthem-sche, P., De Brabander, H. F., *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 22–29.
- [12] Van den Hauwe, O., Dumoulin, F., Antignac, J. P., Bouche, M. P., Elliott, C., Van Peteghem, C., *Anal. Chim. Acta* 2002, 473, 127–134.
- [13] Draisci, R., Marchiafava, C., Palleschi, L., Cammarata, P., Cavalli, S., *J. Chromatogr. B* 2001, 753, 217–223.
- [14] Tang, P. W., Law, W. C., Wan, T. S. M., *J. Chromatogr. B* 2001, 754, 229–244.
- [15] O'Keeffe, M. J., Martin, S., Regan, L., *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 341–350.
- [16] Van den Hauwe, O., Dumoulin, F., Elliott, C., Van Peteghem, C., *J. Chromatogr. B* 2005, 817, 215–223.
- [17] Antignac, J. P., Le Bizec, B., Monteau, F., Poulain, F., André, F., *J. Chromatogr. B* 2001, 757, 11–19.
- [18] Fiori, M., Pierdominici, E., Longo, F., Brambilla, G., *J. Chromatogr. A* 1998, 807, 219–227.
- [19] Ho, E. M., Leung, D. K. K., Wan, T. S. M., Yu, N. H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1120, 38–53.
- [20] Toubert, M. E., Engelen, M. C., Georgakopoulos, C., Van Rhijn, J. A., Nielsen, M. W. F., *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 137–146.
- [21] Mallinson, T. E., Dreas, J. S., Wilson, R. T., Henry, A. C., *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 140–145.
- [22] McLaughlin, L. G., Henion, J. D., *J. Chromatogr.* 1990, 529, 1–19.
- [23] Shearan, P., O'Keeffe, M., Smyth, M. R., *Analyst* 1991, 116, 1365–1368.
- [24] Reig, M., Mora, L., Navarro, J. L., Toldrá, F., *Meat Sci.* 2006, 74, 676–680.
- [25] Huetos, O., Ramos, M., Martín de Pozuelo, M., San Andrés, M., Reuvers, T. B. A., *Analyst* 1999, 124, 1583–1587.
- [26] Volin, P., *J. Chromatogr. B* 1995, 666, 347–353.
- [27] Gonzalo-Lumbreras, R., Muñiz-Valencia, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. A* 2007, 1156, 321–330.
- [28] Stolker, A. A. M., Schwillens, P. L. W. J., Van Ginkel, L. A., Brinkman, U. A. T., *J. Chromatogr. A* 2000, 893, 55–67.
- [29] Tanaka, N., Kobayashi, H., Nakanoshi, K., Minakuchi, H., Ishizuka, N., *Anal. Chem.* 2001, 73, 420A–429A.
- [30] Sinz, K., Cabrera, K., *Environ. Technol.* 2000, 10, 36–37.
- [31] McCalley, D. V., *J. Chromatogr. A* 2002, 965, 51–64.
- [32] Bidlingmaier, B., Unger, K. K., Von Doehren, N., *J. Chromatogr. A* 1999, 832, 11–16.
- [33] Hashem, H., Jira, Th., *Chromatographia* 2005, 61, 133–136.
- [34] Foley, J. P., Dorsey, J. G., *Anal. Chem.* 1983, 55, 730–737.
- [35] Commission of EC, Council Directive 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Commun.* 2002, L221, 8–35.
- [36] Logan, B. K., *Anal. Chim. Acta* 1994, 288, 111–122.

III.4

Mejoras en el tratamiento de muestra para el análisis de esteroides en piensos

III.4.1. Introducción

Como se ha mencionado en anteriores capítulos, el pienso ha sido propuesto como matriz alternativa para el control del uso de esteroides orales. El análisis de esteroides en piensos es una tarea difícil ya que existe una gran variedad de tipos de pienso de composición variable. Para determinar esteroides en muestras biológicas se han desarrollado varios tratamientos de muestra usando ELL y/o EFS [1,2]. Sin embargo, la literatura existente para la determinación de esteroides en muestras de pienso es escasa, probablemente debido a la complejidad de la matriz. La metiltestosterona se ha determinado mediante LC-MS y LC-UV en pienso para peces utilizando ELL con Hex:MeOH:H₂O y EFS con cartuchos poliméricos [3]. La boldenona se ha determinado mediante un método de LC-MS en pienso para terneros mediante ELL con acetato:MeOH, EFS (C₁₈ y -NH₂) y fraccionamiento en una columna C₁₈ utilizando LC [4]. Dexametasona se ha determinado mediante LC-UV en pienso y aguas de consumo animal utilizando ELL con terbutil-metil-eter y EFS (C₁₈ e inmunoafinidad) [5] y en pienso utilizando ELL con diclorometano/hexano y EFS (Si y C₁₈) [6]. También se han determinado varios esteroides (corticoides y/o anabolizantes) mediante LC-UV en pienso para aves utilizando ELL con acetonitrilo y EFS con cartuchos poliméricos [7] y en pienso para lechones utilizando ELL con dietileter y EFS (Si) [8]. Sin embargo, los resultados obtenidos con este último tratamiento de muestra no fueron satisfactorios al aplicarse a otros tipos de pienso.

El presente trabajo consistió en la mejora de un tratamiento de muestra previamente desarrollado para muestras de pienso para lechones para la determinación de esteroides oralmente activos (corticoides y anabolizantes) en muestras de pienso. Con este fin, se empleó una separación previamente descrita mediante LC-UV utilizando una columna Hypersil ODS a 30 °C y una fase móvil ACN:H₂O (35:65, v/v) [8]. Este nuevo procedimiento de preparación de muestra incluye una lixiviación con ACN, saponificación y EFS con cartuchos poliméricos. La validación del método se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por la UE para métodos cuantitativos criba tales como selectividad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, exactitud [9]. Finalmente, el método se aplicó a otros tipos de pienso para distintos animales con resultados satisfactorios.

Referencias

- [1] A.A.M. Stolker, U.A.T. Brinkman, **J. Chromatogr. A**, 1067 (2005) 15.
- [2] G. Balizs, A. Hewitt, **Anal. Chim. Acta**, 492 (2003) 105.
- [3] A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. B**, 721 (1999) 197.
- [4] M.W.F. Nielen, P. Rutgers, E.O. Van Bennekom, J.J.P. Lasaroms, J.A. Van Rhijn, **J. Chromatogr. B**, 801 (2004) 273.
- [5] M. Reig, L. Mora, J.L. Navarro, F. Toldrá, **Meat Sci.**, 74 (2006) 676.
- [6] O. Huetos, M. Ramos, M. Martín de Pozuelo, M. San Andrés, T.B.A. Reuvers, **Analyst**, 124 (1999) 1583.
- [7] R. Muñoz-Valencia, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Sep. Sci.**, 2007, DOI: 10.1002/jssc.200700322.
- [8] R. Gonzalo-Lumbreras, R. Muñoz-Valencia, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. A**, 1156 (2007) 321.
- [9] Commission of the EC. Council Directive 2002/657/EC, **Off. J. Eur. Communities**, L221 (2002) 8.

SAMPLE PREPARATION PROCEDURE IMPROVEMENT FOR STEROIDS (CORTICOIDS AND ANABOLICS) DETERMINATION IN ANIMAL FEED SAMPLES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY

Roberto Muñoz-Valencia¹, Silvia G. Ceballos-Magaña¹, R. Gonzalo-Lumbreras¹, A. Santos-Montes², R. Izquierdo-Hornillos^{1*}.

¹ Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

² Departamento de Ingeniería Mecánica. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad Pontificia Comillas. Alberto Aguilera 25, 28015 Madrid, Spain.

*e-mail: hornillo@quim.ucm.es

Running title: LC method for steroids in feed samples

Corresponding author:

R. Izquierdo-Hornillos (Ph. D.). Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

e-mail: hornillo@quim.ucm.es (R. Izquierdo-Hornillos). Tel: + (34) 913944365; Fax: + (34) 913944329.

Abbreviations: **CC**, corticoids; **AAS**, androgenic anabolic steroids; **CAS**, corticoid and anabolic steroids; **BM**, betamethasone; **BLS**, bolasterone; **B**, boldenone; **CL**, cortisol; **CS**, cortisone; **DHEA**, dehydroepiandrosterone; **DF**, deflazacort; **DM**, dexamethasone; **FL**, fluorocortisone; **FM**, fluoxymesterone; **DMT**, methandrostenolone; **MPL**, methylprednisolone; **MT**, methyltestosterone; **NE**, norethindrone; **NT**, 19-nortestosterone; **PL**, prednisolone; **PS**, prednisone; **CC α** , decision limits; **CC β** , detection capabilities; **PFS**, piglet feed samples; **LLE**, liquid-liquid extraction; **SPE**, solid-phase extraction.

Abstract

A sample preparation procedure for 17 steroids (corticoids and anabolics), used potentially as growth promoting agents, in feed samples has been developed. For this purpose, a LC-UV separation previously reported using a Hypersil C₁₈ column at 30 °C and ACN:H₂O (35:65, v/v) as mobile phase was employed (under these conditions 16 out of 18 steroids were separated in about 30 min). Prior to LC, a sample preparation procedure previously assayed in piglet feed samples consisted on LLE using diethylether and SPE using silica cartridges was improved. The improved procedure includes a leaching process, saponification and SPE. Method validation was carried out according to the EU criteria established for quantitative screening methods in piglet feed samples. The extraction efficiencies, CC α and CC β for these compounds were in the ranges 78-100%, 19-40 µg/kg and 24-53 µg/kg, respectively. The repeatability and the within-laboratory reproducibility at 1, 1.5 and 2 CC β concentration levels were smaller than 9.0, 7.3 and 4.9% and 9.9, 8.0 and 5.8%, respectively. Accuracy was in the 97-101% range. The robustness was evaluated using the Youden robustness test. The proposed method was applied to the analysis of steroids spiked in different kind of animal feed samples with satisfactory results.

Keywords: steroids; growth promoting agents; animal feed.

1. Introduction

Steroids (corticoids and anabolics) are characterized by their activity as growth promoting agents, because they improve feed conversion ratio, increase live weight gain, water retention and fat content, reduce nitrogen retention and have an influence on meat tenderness parameters such as the collagen level [1,2]. In addition, they have a synergetic effect with other illegal growth-promoting agents, such as β -agonists [3]. The use of steroids in livestock breeding is banned within the EU since 1988 [4]. However, the use of these compounds continues in order to produce meat that is more appealing to consumers because of its juicy and lean look. To prevent possible consequences on animal welfare and consumer health, analytical strategies are needed to monitor the use of these compounds at any point in the animal feeding-stuff production chain (e.g. feed, animal feeding water and biological samples like meat and urine) [4]. The control on the use of anabolic agents in meat producing animals (usually performed in slaughterhouses or in farms) is generally based on urine, faeces or hair analysis. The determination of these residues in matrices of biological origin indeed is very complex, e.g. some compounds are strongly metabolized and the metabolites might be still unknown or their standards not available [1]. Feed samples and animal feeding water have also been proposed as alternative matrices to control steroids (parent compounds orally administered) in some countries [4]. Animal feed is a complex matrix very rich in oils and fat, enriched with vitamins (A, B, C, D and E), minerals (salts of Fe, Mn, Cu, etc.) and preservatives (ethoxyquin, propionic acid, etc.) [5]. Moreover, it is not easy to extract the drugs because of the large amounts of proteins and carbohydrates present in the matrix [6]. Due to the large number of steroids potentially added to animal feed, their structural similarity as well as the complexity of feed matrix and the low steroid concentration in feed, analysis of steroids is a challenging task.

Analytical methods for veterinary drugs determination including steroids in food producing animals have been reviewed [6,7]. Many GC-MS methods for measuring steroids mainly in biological samples have been developed [8,9]. GC-MS is a powerful technique since it provides good sensitivity [10], although usually the required derivatization step is time-consuming and can constitute a source of inaccuracy [11]. LC is particularly suited for the analysis of polar, non volatile and heat-labile drugs that cannot be adequately handled by GC-MS. Among the LC methods, the detection modes most commonly used are UV and MS. LC-MS has been successfully used for multiresidue analysis of CC in milk and urine [12,13], and for AAS in urine [14,15], animal tissue [16], animal feeding milk [17] and aqueous samples [18]. Although LC-MS technique is sensitive and can give reliable results, however it requires high operating cost and is not available in all laboratories. LC-UV is a practical and cheaper technique [19] suitable for steroids in urine, pharmaceuticals [20,21] and in feed samples [22]. However, the literature for steroids analysis in feed samples is scarce probably due to the complexity of this matrix, especially for complex mixtures. Methyltestosterone was extracted from fish feed using LLE (hexane/MeOH-water) and SPE (polymeric cartridges), and further LC using UV and MS detection [5]. Several CC have been identified by LC-MS in milk replacers using previously SPE (C_{18} cartridges) [17]. Boldenone has been determined in feed samples for veal calves using LLE (acetate buffer:MeOH), SPE (C_{18} and NH_2 cartridges) and LC fractionation of the extracts on a C_{18} column before LC-MS-MS analysis [23]. Dexamethasone has been determined by LC-UV in feed and animal feeding water using

LLE (tertbutyl-methyl-ether) and SPE (-NH₂ and immunoaffinity cartridges) [24] and in feed using LLE (dichloromethane/hexane) and SPE (Si and C₁₈ cartridges) [25]. Several steroids (corticoids and/or anabolics) have also been determined by LC-UV in poultry feed using LLE (acetonitrile) and SPE (polymeric cartridges) [26] and in piglet feed samples using LLE (diethyl ether) and SPE (Si cartridges) [22].

In the present paper, an improvement of a sample preparation procedure for corticoid and anabolic steroids (CAS) (Table 1) in feed samples has been developed. This procedure is based on another one reported for piglet feed samples which used a LC-UV separation using a Hypersil ODS column at 30 °C and ACN:H₂O (35:65, v/v) as mobile phase [22]. The improved sample preparation procedure includes a leaching process, saponification and SPE. Method validation was carried out according to the EU criteria established for quantitative screening methods in piglet feed samples [27]. Finally, the proposed method was applied to other feed samples with satisfactory results.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Prednisolone (PL) (11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), prednisone (PS) (17 α ,21-dihydroxy-1,4-pregnadiene-3,11,20-trione), cortisol (CL) (11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione), fluorocortisone (FL) (9 α -fluoro-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione), cortisone (CS) (17 α ,21-dihydroxy-4-pregnene-3,11,20-trione), methylprednisolone (MPL) (6 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), betamethasone (BM) (9 α -fluoro-16 β -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), dexamethasone (DM) (9 α -fluoro-16 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), fluoxymesterone (FM) (9 α -fluoro-11 β ,17 β -dihydroxy-17-methyl-4-androsten-3-one), boldenone (B) (1,4-androstadien-17 β -ol-3-one), deflazacort (DF) ((11 β ,16 β)-21-(acetyloxy)-11-hydroxy-2'-methyl-5'H-pregna-1,4-diene[17,16-d]-oxazole-3,2-O-dione), 19-nortestosterone (NT) (17 β -hydroxy-19-norandrost-4-en-3-one), methandrostenolone (DMT) (17 β -hydroxy-17 α -methyl-1,4-androstadien-3-one), norethindrone (NE) (19-nor-17 α -ethinyl-4-androsten-17 β -ol-3-one), methyltestosterone (MT) (17-hydroxy-17-methylandrost-4-en-3-one), bolasterone (BLS) (17-hydroxy-7,17-dimethylandrost-4-en-3-one) and dehydroepiandrosterone (DHEA) (5-androsten-3 β -ol-17-one) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). A stock solution of these analytes (1000 μ g/mL) was prepared in methanol and stored at -20 °C. A single or a mixture of CAS was prepared daily by diluting the stock solution with methanol and used for different studies.

LC-grade methanol (MeOH), diethyl ether (DEE), acetonitrile (ACN) and ethyl acetate (AcEt) from Scharlab (Barcelona, Spain), Milli-Q water from Millipore (Molsheim, France), millipore 0.45 μ m nylon filters from Bedford (MA, USA), Absolut Nexus (3 ml and 60 mg polymeric sorbent) cartridges from Varian (Harbor City, CA, USA) were used. Other used chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Apparatus

The chromatographic system consisted of the following components all of them from Jasco Analítica (Madrid, Spain): A PU-2089-Plus solvent delivery system, a multiwavelength MD-1510 photodiode-array detector (DAD) covering the range 190-600 nm and interfaced to a computer for data acquisition. A 6-port Rheodyne valve with a 20 μ L sample loop injector (Cotati, CA, USA), a Jones-Chromatography block heated series 7960 for thermostating columns in the range 30-70°C (Seagate Technology, Scotts Valley, CA, USA), a Hypersil ODS (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μ m) column from Phenomenex (Torrance, CA, USA), a vortex mixer Mixo-Tub-30 from Crison (Barcelona, Spain), a thermostated bath Ultrasons-H from Selecta (Barcelona, Spain) operating in the range 30-75 °C and a Visiprep vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were used.

2.3. Mobile phase and chromatographic analysis

The mobile phases were prepared daily by mixing Milli-Q water with ACN at the required volume ratio by programming the pump. All solvents and mobile phases were filtered under vacuum through 0.45 μ m Nylon filters and degassed using a vacuum degasser.

Once the column had been conditioned with ACN:H₂O (35:65, v/v) as mobile phase, chromatograms were obtained at the programmed temperature (30 °C), 1 mL/min flow-rate and UV absorbance-DAD detection in the range 190-360 nm [22]. Peaks identification and peak purity of CAS were performed by comparison of their retention time and UV spectra with those of compounds previously registered by injection of each one individually. With exception to DHEA which was monitored at 200 nm, steroids analysis was carried out at 245 nm.

2.4. Sample preparation

2.4.1. For CAS analysis

Animal feed for piglet was kindly supplied from Nutral (Madrid, Spain) with the following composition in w/w units: humidity (7.6%), protein (20.9%), fat (7.0%), fiber (2.1%), ashes (5.7%), Ca (0.62%) and P (0.46%).

Prior to LC analysis, sample preparation as shown in Fig. 1, consisted of three main steps (leaching of the mixture feed-CAS using ACN, saponification and SPE of CAS). For this purpose, several volumes from a methanolic solution (25 μ g/mL) of compounds under study were evaporated to dryness (0.2-2.0 μ g range), including MPL or B as IS (0.4 μ g), in a 10 mL stoppered centrifuge tube. The residue was mixed with homogenized feed sample (1 g) and the mixture was further leached using ACN. The mixture was shaken and centrifuged at 3700 g. The ACN phase was removed from the mixture, filtrated using nylon filters, evaporated to 0.5 mL, added with sodium hydroxide solution and processed through polymeric Nexus cartridges which had previously been conditioned with MeOH and water. After washing the cartridges with water and a mixture of water-MeOH, the elution of CAS was performed using AcEt. The eluate was evaporated to dryness at 40 °C under nitrogen sparge. The dried residue was dissolved using MeOH and 20 μ L were injected into the LC system.

Blank piglet feed samples (PFS) were previously checked for CAS following the above procedure with negative results.

2.4.2. For CAS extraction efficiencies

Blank samples were prepared following the procedure described above. Extraction efficiencies, %E, for CAS were assessed using a Hypersil ODS column (30 °C), ACN:H₂O (35:65 v/v) as mobile phase, 1 mL/min flow-rate and two different calibration graphs. The first calibration was obtained by adding standard solutions of CAS in the 0.5-10 µg/mL range (equivalent to 0.1-2 mg/kg), including MPL or B as I.S at 2 µg/mL, to the dried residue obtained from blank samples, and the slope, S_1 , were calculated for each compound. A second calibration graph was also obtained from PFS spiked with CAS in the 0.04-2 mg/kg range, including MPL or B as I.S at 0.4 mg/kg, before applying the above sample preparation procedure, and the corresponding slope, S_2 , was calculated for each compound. The %E were calculated using the equation $E (\%) = (S_2/S_1) \times 100$. In this way, the %E values obtained for CAS were independent of the concentration range used.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of sample preparation

The analysis of steroids in feed samples generally is not an easy task due to the diversity of farm animals and age (a plethora of feeds with variable composition are commercially available or homemade) requiring then complex sample preparation procedures [5,6]. In a previous paper, a sample preparation procedure for the analysis of CAS in PFS was reported [22]. This procedure consisted in a leaching of CAS using DEE and further SPE using silica cartridges (previously conditioned with DEE, CAS were eluted with MeOH), and analyzed as described in 2.3 section. This method was applied to other feed samples and the resulting extracts were oily and interferences were observed at low retention times.

To improve these results, another sample preparation procedure reported for the analysis of corticoids in feed samples by LC using a monolithic column was tested [26]. This procedure consisted in a leaching with ACN. Further, the ACN phase was removed, partially evaporated and treated with NaOH solution to saponificate and then eliminate the fat material leached from feed matrix. This mixture was processed through polymeric Nexus cartridges (previously conditioned with MeOH and H₂O). After washing the cartridges with H₂O, the elution was performed using AcEt. This assay reveals that the chromatographic front width overlaps with some CAS eluted at low retention times, requiring the analysis cleaner extracts. For this purpose, preliminary studies were carried out with the aim to select factors of the sample pre-treatment which may influence the results. The leaching process was studied using DEE and AcEt. The resulting extracts were oily and not adequate for the column life. For these reasons ACN was maintained as leaching solvent. Further, after applying the saponification process, the influence of SPE using C₁₈ and Strata-X (polymeric) cartridges was studied. The results do not improved those obtained using Nexus cartridges which were maintained for further experiments.

Based on the above results, before elution of CAS using AcEt, a washing step of the polymeric Nexus cartridges was also studied because the front width (polar interferences) coeluted with some CAS.

To minimize this front, the water pH of the washing step was varied in the 7-11 range to complete the dissociation of possible compounds in the saponification step. In this way, using pH 10 the chromatographic front width was significantly reduced. However, this treatment was not enough to carry out the CAS analysis because interferences at low retention times were still detected. A subsequent washing step using a binary solution of MeOH:H₂O (v/v) was studied by varying the MeOH percentage in the range 0-60%. The most favorable results were obtained using 40% MeOH. In this way, interferences at low retention times were eliminated. The extracts obtained using lower %MeOH were not sufficient clean and higher %MeOH eluted partially some of the less retained CAS.

In summary, the improved sample preparation procedure (using ACN as leaching solvent, saponification with NaOH and SPE using a washing step prior elution with AcEt), the washing step involved a first treatment using H₂O pH=10 and finally 40% MeOH, was adequate for feed samples analysis spiked with CAS.

3.2. Analysis of piglet feed samples and method validation

The above separation was applied to the analysis of PFS spiked with CAS before applying the sample preparation procedure (2.4.1 section). The quantitative screening method validation has been carried out according to the Commission Decision 2002/657/EC. For this purpose, eight mandatory performance characteristics for the conventional validation approach were determined: calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits, detection capabilities, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), accuracy, selectivity and robustness [27].

3.2.1. Calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits and detection capabilities

Several CAS were tested as internal standard (IS). MPL and B were judged to be the best for quantitation purposes. These compounds eluted between CS-BM and FM-NT, respectively and were separated up to baseline. B was used as IS for (PL, CS, MPL, BM, FM, NT, DMT, NE, MT and BLS) and MPL for (CL, DM, B and DF; FL and PS).

Calibration graphs were performed by adding to CAS-free PFS, standards of CAS at seven concentration levels in the 0.04-2 mg/kg range using 0.4 mg/kg MPL or B as IS and following the procedure described in 2.4.1 section. These mixtures were analyzed using the Hypersil ODS column at 30 °C, ACN:H₂O (35:65, v/v) as mobile phase, a flow-rate of 1 mL/min and UV-absorbance detection at 245 nm (200 nm for DHEA). The results were analyzed by linear regression. Plotting each steroid peak area to IS ratio (y) vs. the concentration (x = mg/kg) of each one, the calibration equation $y = A+Bx$ was obtained. The parameters A (intercept), B (slope) and r (regression coefficient) are summarized in Table 2. The errors in the slopes and intercepts do not reveal significant differences. In all cases the intercepts were not significantly different from zero.

Extraction efficiencies, %E, for CAS were assessed using calibration graphs according to the procedure described in 2.4.2. section. The values obtained are independent of the concentration used (within the calibration range) and are shown in Table 2.

Decision limit ($CC\alpha$) is defined as the limit at and above which it can be concluded with an error probability of α that a sample is non-compliant and detection capability ($CC\beta$) as the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β [27]. $CC\alpha$ were evaluated by analyzing 20 blank PFS and calculating the signal to noise ratio at the time window in which the analyte is expected. $CC\alpha$ (α error = 1%) were set as three times the signal to noise ratio (values in Table 2). In the same way, $CC\beta$ were evaluated by analyzing 20 blank PFS spiked with CAS at the decision limits. Once the analytes were identified, $CC\beta$ (β error = 5%) was set as the value of the decision limit plus 1.64 times the standard deviation of the 20 spiked feed (at $CC\alpha$ concentration) of the measure content (Table 2).

3.2.2. Precision and accuracy

The repeatability was examined by analyzing six different mixtures of CAS using PFS spiked with 1, 1.5 and 2 times $CC\beta$ concentration and by running each mixture once ($n = 18$), whereas within-laboratory reproducibility was evaluated for three different days ($n = 54$). The mean concentrations and CVs obtained are summarized in Table 3.

Accuracy was assessed by analyzing six different mixtures at three different concentration levels of CC (1.0, 1.5 and 2.0 $CC\beta$) by replicate measurements ($n = 18$). Standards of CAS were added to PFS, processed according to sample preparation procedure (2.4.1 section), and analyzed using the proposed LC method. The concentrations were calculated using the equation $x = (y-A)/B$ from the calibration graphs described in 3.2.1. Table 3 shows the mean recoveries, % R, obtained for CAS.

3.2.3. Selectivity

Selectivity was assessed by a qualitative comparison of the chromatograms obtained from piglet feed and standard samples. Fig. 2A-C shows the chromatograms obtained for a standard mixture of 2 $\mu\text{g/mL}$ CAS (A), and a PFS blank (B) and a PFS spiked with 0.4 mg/kg CAS (C) following the procedure described in 2.4.1 section. As can be seen, possible interferences due to the substances present in samples were not observed. In addition, a detection and identification process based on retention times and a diode array detector (DAD) was carried out [28]. The RSD ($n = 6$) of the retention times for CAS under Fig. 2B conditions were lower than 1% for each one. The UV spectrum of each peak in the chromatogram was stored and subsequently compared with standards. The spectra were normalized and overlaid. Impurities were investigated further by displaying the spectra obtained at different points across the peak with negative results. Fig. 2B and C chromatograms indicate that this procedure is adequate for analysis of CC under study in PFS with screening purposes.

3.2.4. Robustness

The robustness study was carried out using the Youden test described in the Council Directive 2002/657/EC [27]. For this purpose, minor changes of seven variables in the sample preparation procedure: analyst, lixiviation volume, several SPE parameters (cartridges age, water pH wash, %MeOH wash, elution volume) and final evaporation temperature, were chosen. As shown in Table 4, eight

experiments were conducted for the evaluation of seven selected factors by spiking eight PFS with CAS at CC β concentration and processed according to sample preparation procedure. The effect of a particular variable was estimated by subtracting the mean result obtained with the variable at “high level”, indicated by a capital letter, from the mean result achieved with it at “low level”, indicated with the corresponding small letter (Table 4). For each variable, the calculated difference was indicated as D_i and the standard deviation of the differences, S_{D_i} , was calculated by Ec. 1:

$$S_{D_i} = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad \text{Ec. 1}$$

When S_{D_i} is significantly larger than the standard deviation of the method, it means that all the chosen factors together have an effect on the result.

Following the experimental plan, the results in Table 4 indicate “SPE %MeOH wash” is the parameter with the larger difference. Regarding this parameter for the high level (experiments S, U, X and Z), the mean recoveries obtained were in the range 93-101% (S in the range 3-13%) and for the Operator No. 2 (experiments W-Z) were in the 97-103% (S in the range 3-12%). These results demonstrate that all the chosen factors together do not significantly affect the method performances.

3.3. Application of the proposed method to other feeds

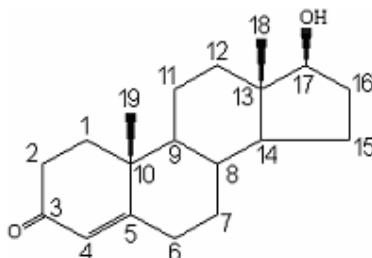
The proposed method was applied to other feed samples supplied by NUTRAL S. A. Table 5 shows the composition of feeds under study as well as their application. As can be seen in Fig. 3 the blanks obtained for these feeds are very similar to those obtained for the feed herein studied (Fig. 2C). Moreover, CAS were extracted from these spiked feed with similar %E values to those obtained for PFS. These facts imply that the proposed method can be applicable to the feeds cited and probably to many more.

3.4. Conclusions

An improved sample preparation procedure to analyze 17 steroids (corticoids and androgenic anabolics) in feed samples has been developed. This procedure is based on two prior sample preparation procedures (one for corticoids and anabolics and the other for corticoids). After selecting ACN as leaching solvent, applying a saponification step and selecting Nexus SPE cartridges using AcEt as eluent, the key of the sample preparation improvement was achieved using a first washing with water at pH 10 and a second one using 40% MeOH. Method validation was carried out according to the EU criteria established for quantitative screening methods in piglet feed samples [27] using a mobile phase previously described [22]. Finally, the proposed method was applied to other feed samples with satisfactory results.

This work has been supported by Project (07G/047.1/2003 (Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid) (CM). R. Muñiz-Valencia thanks CONACyT-México for a grant and the authors also thank A. Cubedo of Nutral for supplying feed samples.

Table 1. Structures of steroids (corticoids and anabolics).



CAS	C1-2	C3	C4-5	C5-6	C7	C9	C11	C16	C17	C19
Prednisolone (PL)	=						-OH		-COCH ₂ OH	
Prednisone (PS)	=						=O		-COCH ₂ OH	
Cortisol (CL)							-OH		-COCH ₂ OH	
Fluorocortisone (FL)						-F	-OH		-COCH ₂ OH	
Cortisone (CS)							=O		-COCH ₂ OH	
Methylprednisolone (MPL)	=			-CH ₃ C6			-OH		-COCH ₂ OH	
Betamethasone (BM)	=					-F	-OH	-CH ₃ β	-COCH ₂ OH	
Dexamethasone (DM)	=					-F	-OH	-CH ₃ α	-COCH ₂ OH	
Fluoxymesterone (FM)						-F	-OH		-CH ₃	
Boldenone (B)	=									
Nortestosterone (NT)										-H
Deflazacort (DF) ^(a)	=						-OH		-	
Metandrostenolone (DMT)	=								COCH ₂ OCH ₃	
Norethindrone (NE)									-CH ₃	
Methyltestosterone (MT)									-C≡CH	-H
Bolasterone (BLS)									-CH ₃	
Dehydroepiandrosterone (DHEA)		-OH	-	=					-CH ₃	

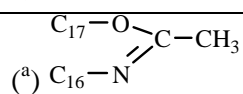


Table 2. Linear regression parameters obtained from calibration graphs using piglet feed samples spiked with CAS, decision limits ($CC\alpha$), detection capabilities ($CC\beta$) and extraction efficiencies (%E) for CAS using piglet feed samples.

CAS	A	B	r	$CC\alpha$ ($\mu\text{g/kg}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g/kg}$)	% E \pm CV
PL	-0.01	2.22	0.999	21	28	81 ± 5
PS	-0.03	2.10	0.997	19	30	82 ± 6
CL	-0.01	2.35	0.999	20	28	76 ± 8
FL	-0.04	2.15	0.995	25	31	86 ± 6
CS	-0.05	2.40	0.995	20	25	88 ± 4
MPL	-0.06	1.96	0.997	21	29	93 ± 3
BM	-0.06	2.01	0.999	24	30	96 ± 2
DM	-0.11	2.25	0.999	20	26	87 ± 5
FM	-0.03	2.94	0.999	19	27	98 ± 5
B	-0.06	3.30	0.996	20	24	96 ± 6
NT	-0.08	3.38	0.999	19	24	100 ± 3
DMT	-0.07	2.63	0.998	22	31	97 ± 2
DF	-0.02	2.38	0.999	24	30	97 ± 4
NE	-0.05	3.38	0.999	20	28	100 ± 2
MT	-0.08	3.03	0.999	25	33	97 ± 3
BLS	-0.06	3.58	0.999	26	32	98 ± 2
DHEA	-0.10	1.83	0.992	40	53	93 ± 7

Table 3. Precision and accuracy at different concentration levels of CAS ^a.

CAS	Repeatability						Within-laboratory reproducibility						Accuracy
	CC β	%CV	1.5CC β	%CV	2CC β	%CV	CC β	%CV	1.5CC β	%CV	2CC β	%CV	
PL	29	8.1	41	6.4	59	3.3	28	8.8	42	7.4	57	3.8	101 \pm 2
PS	28	8.5	45	7.2	61	4.8	30	9.2	45	7.9	60	5.3	99 \pm 2
CL	27	7.2	43	5.4	56	2.7	29	8.5	43	6.2	56	3.0	98 \pm 3
FL	31	8.9	47	6.3	61	4.0	31	9.3	46	7.4	61	5.7	100 \pm 4
CS	26	7.8	38	4.0	48	3.1	25	8.3	38	4.8	49	4.1	97 \pm 3
MPL	29	7.3	43	4.5	56	3.3	30	9.6	44	5.9	57	4.7	99 \pm 3
BM	30	6.6	45	4.1	60	3.2	30	8.5	45	5.3	60	4.6	99 \pm 1
DM	26	6.3	38	4.4	50	2.9	26	8.7	39	5.9	51	3.8	98 \pm 2
FM	26	7.9	40	5.2	52	3.6	27	8.5	41	6.7	54	4.5	97 \pm 2
B	24	6.3	36	3.7	47	3.0	24	7.9	36	4.8	48	3.6	101 \pm 3
NT	24	5.9	35	4.3	47	2.8	24	6.6	36	5.9	47	3.7	98 \pm 2
DMT	31	7.4	47	5.0	62	3.2	31	8.1	47	6.2	62	4.1	100 \pm 3
DF	30	8.3	45	4.8	61	3.5	30	9.0	45	5.7	60	4.1	101 \pm 3
NE	28	8.7	41	5.2	55	4.2	28	9.8	42	6.1	55	5.7	98 \pm 2
MT	33	6.2	50	5.4	64	3.7	33	7.7	50	6.0	65	4.6	99 \pm 2
BLS	32	5.9	47	4.5	62	3.4	32	6.6	48	6.4	63	4.9	99 \pm 3
DHEA	54	8.8	79	6.1	106	4.6	53	9.4	80	7.3	106	5.1	97 \pm 4

^a CC β units are $\mu\text{g/kg}$.

Table 4. Youden robustness test: variables and their levels in the experimental design and results obtained for piglet feed samples spiked with CAS.

Selected variable	Experiment No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Analyst	A	A	A	A	a	a	a	a
Lixiviation volume	B	B	b	b	B	B	b	b
SPE age	C	c	C	c	C	c	C	c
SPE water pH wash	D	D	d	d	d	d	D	D
SPE % MeOH wash	E	e	E	e	e	E	e	E
SPE elution-volume	F	f	f	F	F	f	f	F
Final extract evaporation temperature	G	g	g	G	g	G	G	g
Observed results	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Selected variable	Units	Abbreviation ^a	High level	Low level
Analyst	----	A,a	1	2
Lixiviation volume	mL	B,b	3.5	4.5
SPE age	----	C,c	Old	New
SPE water pH wash	pH	D,d	9.5	10.5
SPE % MeOH wash	ml	E,e	35	45
SPE elution-volume	mL	F,f	3.5	4.5
Final extract evaporation temperature	°C	G,g	35	45

Variable	Differences (%)
Analyst	5.7
Lixiviation volume	6.1
SPE age	2.6
SPE water pH wash	7.1
SPE % MeOH wash	15.3
SPE elution-volume	5.5
Final extract evaporation temperature	5.8

^a Upper and lower case letters represent high and low levels values of the variable, respectively.

^b Cartridge was maintained wet at all stages during the clean up process.

^c The cartridge was left to dry for 1 min after sample application.

Table 5. Composition of feeds under study in % (w/w).

No	Animal	Humidity	Protein	Fat	Fiber	Starch	Calcium	Phosphorus
4	Cow	10.9	16.5	2.6	7.9	33.9	0.97	0.54
6	Calf	11.6	14.6	2.7	7.2	39.6	0.97	0.47
9	Growing pig	10.9	16.4	2.8	4.4	43.4	0.90	0.51
10	Finishing pig	11.0	16.6	3.3	4.3	44.2	0.69	0.50
15	Laying hen	11.0	15.1	3.2	3.4	46.6	2.17	0.40
17	Poultry	11.1	17.0	3.8	3.9	42.7	1.02	0.55
21	Nursing calf	10.1	18.3	4.2	3.3	43.2	0.86	0.58
23	Nursing lamb	10.7	21.5	4.2	3.9	44.1	0.85	0.47

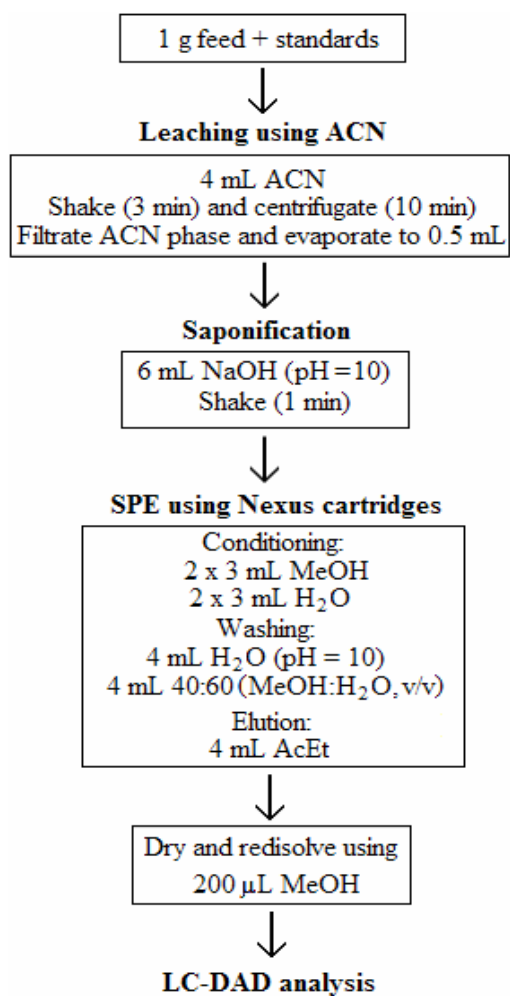


Figure 1. Scheme of the procedure used for feed samples preparation.

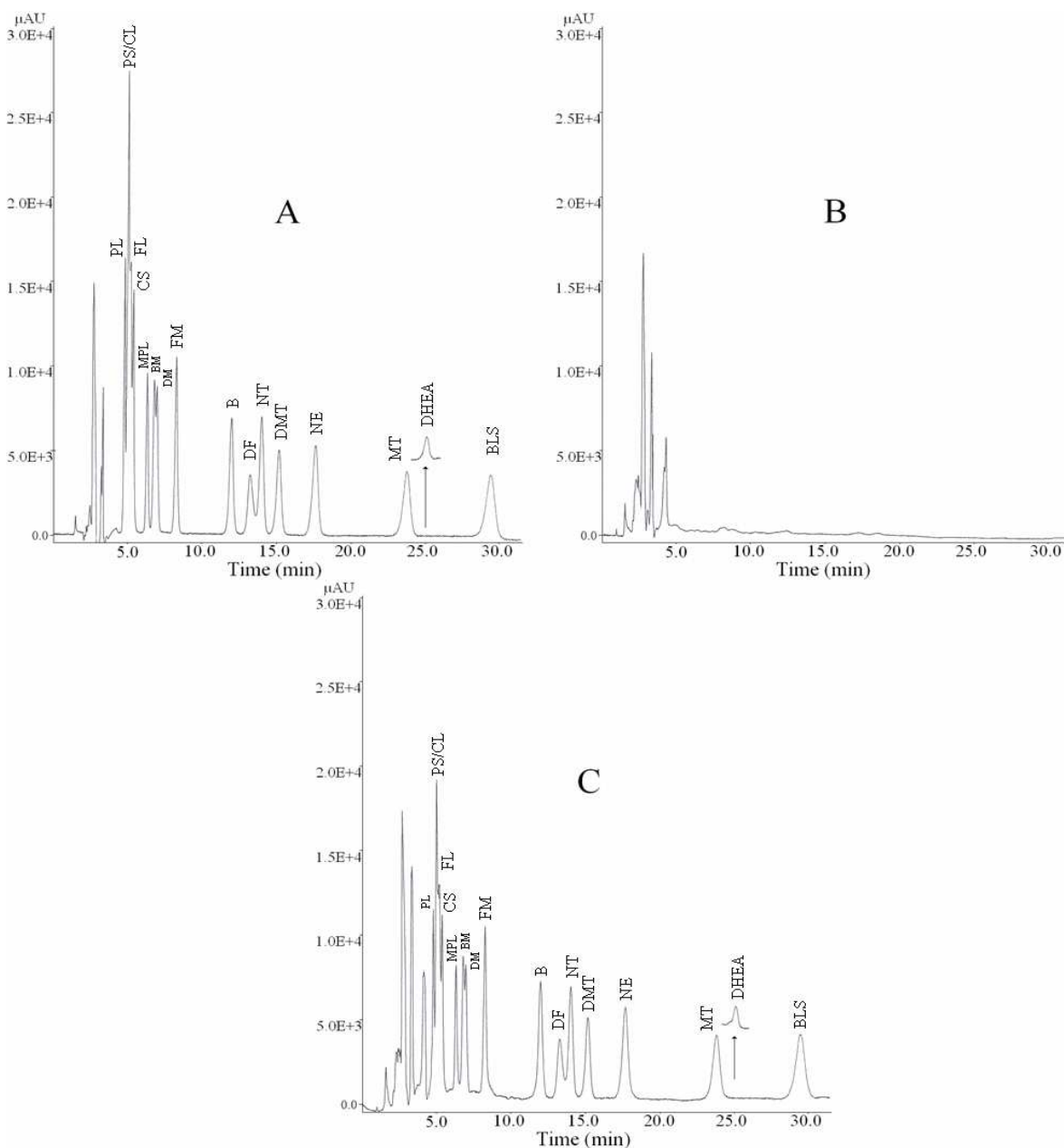


Figure 2. Chromatograms obtained at 245 nm (200 nm for DHEA) using a Hypersil column (30 °C), ACN:H₂O (35:65, v/v) as mobile phase and 1 mL/min flow-rate for a standard mixture of 2 μg/mL CAS (A), and using the procedure described in 2.4.1. section, for a piglet feed blank (B) and for a finishing PFS spiked with 0.4 mg/kg CAS (C).

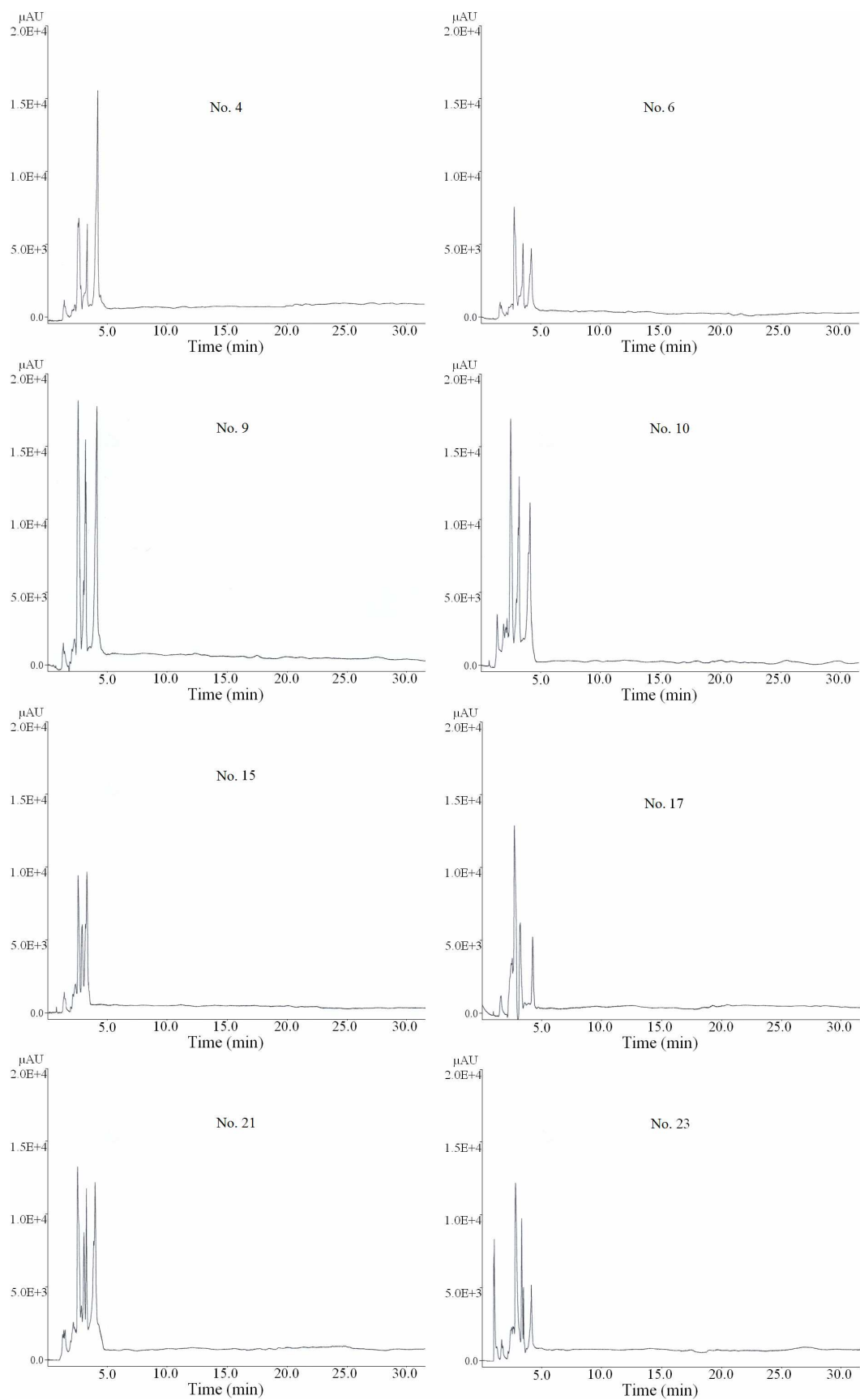


Figure 3. Chromatograms obtained from different feed blank samples described in Table 5 and in the same conditions as in Fig. 2.

REFERENCES

- [1] Courtheyn, D., Le Bizec, B., Brambilla, G., De Brabander, H.F., Cobbaert, E., Van de Wiele, M., Vercammen, J., De Wasch, K., *Anal. Chim. Acta* 2002, *473*, 71-82.
- [2] Hartmann, S., Steinhart, H., *J. Chromatogr. B* 1997, *704*, 105-117.
- [3] Antignac, J.P., Le Bizec, B., Monteau, F., André, F., *Steroids* 2002, *67*, 873-882.
- [4] Commission of EC. Council Directive 96/23/EC. *Off. J. Eur. Communities* 1996, *L125*, 10.
- [5] Marwah, A., Marwah, P., Lardy, H., *J. Chromatogr. B* 2005, *824*, 107-115.
- [6] Stolker, A.A.M., Brinkman, U.A.T., *J. Chromatogr. A* 2005, *1067*, 15-53.
- [7] Balizs, G., Hewitt, A., *Anal. Chim. Acta* 2003, *492*, 105-131.
- [8] Nielen, M.W.F., Lasaroms, J.J.P., Essers, M.L., Sanders, M.B., Heskamp, H.H., Bovee, T.F.H., van Rhijn, J. (Hans), Groot, M.J., *Anal. Chim. Acta* 2007 *586* 30-34.
- [9] Kootstra, P.R., Zoontjes, P.W., van Tricht, E.F., Sterk, S.S., *Anal. Chim. Acta* 2007 *586* 82-92.
- [10] Shimada, K., Mitamura, K., Higashi, T., *J. Chromatogr. A* 2001 *935* 141-172.
- [11] Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M.J., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2002, *974*, 23-51.
- [12] Mc Donald, M., Granelli, K., Sjöberg, P., *Anal. Chim. Acta* 2007, *588*, 20-25.
- [13] Touberg, M.E., van Engelen, M.C., Georgakopoulos, C., van Rhijn, J.A., Nielen, M.W.F., *Anal. Chim. Acta* 2007, *586*, 137-146.
- [14] Leinonen, A., Kuuranne, T., Kotiano, T., Kostianen, R., *Steroids* 2004, *69*, 101-109.
- [15] Yu, N.H., Ho, E.N.M., Leung, D.K.K., Wan, T.S.M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005 *37*, 1031-1038.
- [16] Xu, C.L., Chu, X.G., Peng, C.F., Li, Z.Y., Wang, Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, *41*, 616-621.
- [17] Fiori, M., Pierdominici, E., Longo, F., Brambilla, G., *J. Chromatogr. A* 1998, *807*, 219-227.
- [18] Noppe, H., Verheyden, K., Gillis, W., Courtheyn, D., Vanthemsche, P., De Brabander, H.F., *Anal. Chim. Acta* 2007, *586*, 22-29.
- [19] Gatti, R., Cappellin, E., Zecchin, B., Antonelli, G., Spinella, P., Montero, F., De Palo, E.F., *J. Chromatogr. B* 2005, *829*, 154-159.
- [20] Gonzalo-Lumbreras, R., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. B* 2000, *742*, 1-11.
- [21] Gonzalo-Lumbreras, R., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. B* 2000, *742*, 47-57.
- [22] Gonzalo-Lumbreras, R., Muñoz-Valencia, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. A*, 2007, *1156*, 321-330.
- [23] Nielen, M.W.F., Rutgers, P., van Bennekom, E.O., Lasaroms, J.J.P., Van Rhijn, J.A., *J. Chromatogr. B* 2004, *801*, 273-283.
- [24] Reig, M., Mora, L., Navarro, J.L., Toldrá, F., *Meat Sci.*, 2006, *74*, 676-680.
- [25] Huetos, O., Ramos, M., Martin de Pozuelo, M., San Andres, M., Reuvers, T.B.A., *Analyst*, 1999, *124*, 1583-1587.
- [26] Muñoz-Valencia, R., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Sep. Sci.* 2007, DOI: 10.1002/jssc.200700322.
- [27] Commission of the EC. Council Directive 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Communities* 2002, *L221*, 8.
- [28] Logan, B.K., *Anal. Chim. Acta* 1994, *288*, 111-122.

III.5

**Desarrollo y validación de un método por HPLC con
elución en gradiente para la determinación de esteroides
(corticoides y anabolizantes) en aguas de consumo
animal**

III.5.1. Introducción

La UE establece los residuos a detectar en diferentes tipos de muestras entre las que se encuentran los esteroides para un amplio rango de compuestos [1]. Usualmente, el agua destinada al consumo animal es analizada para evitar la administración de esteroides oralmente activos.

Las separaciones de mezclas complejas de esteroides mediante LC con elución isocrática son en muchos casos inapropiadas debido al poco espacio disponible en los cromatogramas. Las desventajas de la elución isocrática residen en la pobre resolución para los compuestos inicialmente eluidos, ensanchamiento de picos fuertemente retenidos, picos asimétricos y separaciones largas. Todos estos problemas se resuelven eluyendo en gradiente, aportando ventajas tales como la reducción significativa del tiempo de análisis, el incremento de la resolución global, picos simétricos, mejoras en la sensibilidad. Sin embargo, la mejor prestación es que proporciona máxima resolución en un tiempo mínimo. El uso de la temperatura y pendiente del gradiente para controlar la resolución entre picos es menos efectiva que otras variables tales como disolvente y tipo de columna, debido a que estas últimas son individualmente más importantes para modificar la separación [2].

Se han desarrollado varios métodos cromatográficos para analizar esteroides en aguas [3,4]. En LC se han descrito métodos para la detección de hormonas sexuales y compuestos similares en aguas [5] y para dexametasona en agua destinada al consumo animal [6]. En GC se ha reportado un método criba para la detección de CC en preparaciones acuosas (e.g. agua potable) disponibles comercialmente en el “mercado negro” [7].

El presente trabajo consistió en el estudio de la separación mediante LC-UV y diferentes columnas para la determinación de 20 esteroides (EAA y CC). Inicialmente, se llevaron a cabo separaciones utilizando una fase móvil ACN:H₂O (35:65 v/v) previamente descrita [8] y diferentes columnas de fase reversa (Hypersil C₁₈, Gemini C₁₈, Purospher Star C₁₈, Synergi Max C₁₂ y Synergi Fusion), con el fin de obtener información para optimizar la elución en gradiente. Todas las columnas, excepto la Gemini y Fusion, separaron 17 STER (los últimos 2 esteroides no se tomaron en cuenta debido a su fuerte retención) en un intervalo de tiempo de análisis de 40-50 min. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio en gradiente con las columnas propuestas para mejorar las prestaciones de las separaciones obtenidas (resolución, número de esteroides separados y tiempo de análisis). Finalmente, se eligió la columna Purospher debido a que permitió la separación de 19 esteroides en 26 min. El tratamiento de muestra utilizado incluyó EFS con cartuchos C₁₈. La validación del método se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por la UE para métodos criba cuantitativos tales como selectividad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, exactitud [9]. El método propuesto se aplicó a otras aguas con resultados satisfactorios.

Referencias

- [1] Commission of EC. Council Directive 96/23/EC. **Off. J. Eur. Communities**, L125 (1996) 10.
- [2] J.W. Dolan, L.R. Snyder, D.L. Saunders, L. Van Heukelem, **J. Chromatogr. A**, 803 (1998) 33.
- [3] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, **J. Chromatogr. A**, 974 (2002) 23.
- [4] M.J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, **J. Chromatogr. A**, 1000 (2003) 503.
- [5] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 41 (2006) 1303.
- [6] M. Reig, L. Mora, J.L. Navarro, F. Toldrá, **Meat Sci.**, 74 (2006) 676.
- [7] N. Noppe, K. Verheyden, W. Gillis, D. Courtheyn, P. Vanthemsche, H.F. De Brabander, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 22.
- [8] Santos-Montes, A., Gonzalo-Lumbreras, R., Gasco-Lopez, A.I., Izquierdo-Hornillos, R., **J. Chromatogr. B**, 652 (1994) 83.
- [9] Commission of EC. Council Directive 2002/657/EC. **Off. J. Eur. Communities**, L221 (2002) 8.

Roberto Muñoz-Valencia¹
Raquel Gonzalo-Lumbreras¹
Ana Santos-Montes²
Roberto Izquierdo-Hornillos¹

¹Departamento de Química
Analítica, Facultad de Ciencias
Químicas, Universidad
Complutense, Madrid, Spain

²Departamento de Ingeniería
Mecánica, Escuela Técnica
Superior de Ingeniería,
Universidad Pontificia Comillas,
Madrid, Spain

Original Paper

Quantitative screening for steroids in animal feeding water using reversed phase LC with gradient elution

Several isocratic separations for the determination of 20 steroids (STER) in animal feeding water samples (AFWS) from drinking-trough by LC using a mobile phase ACN/H₂O (35:65 v/v) and different RP columns (Hypersil C18, Gemini C18 (GM), Purospher Star C18, Synergi Max C12, and Synergi Fusion) and UV detection were obtained. The elution order was the same: a first group of corticoids (CC) was early eluted, a second group of CC and anabolics (AAS) exhibited intermediate retention, and a third group constituted by AAS was strongly retained. To improve the separation performances of the isocratic separations an ACN gradient elution optimization was carried out for each column. The most satisfactory results were obtained using a Purospher column which allowed the separation of 19 STER in an analysis time close to 26 min. After sample preparation using SPE, method validation was performed in an AFWS spiked with STER according to the EC decision criteria established for quantitative screening methods. For this purpose calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits, detection capabilities, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), accuracy, selectivity, and robustness were evaluated. The proposed method was applied to other AFWS with satisfactory results.

Keywords: Animal feeding water / Gradient elution / Growth promoting agents / LC / Steroids

Received: August 9, 2007; revised: October 12, 2007; accepted: October 12, 2007

DOI 10.1002/jssc.200700382

1 Introduction

The Council Directive 96/23/EC for food control of animal origin formulates the measures to monitor residues of a wide range of compounds in live animals, animal products, feed, and animal feeding water samples (AFWS). Steroids (STER; included in Annex A) have no legal basis for their use or are explicitly banned. How-

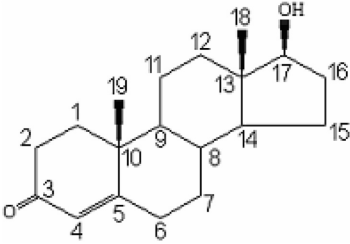
ever, the use of these compounds continues in order to produce meat that is more appealing to consumers because of its juicy and lean look. To prevent possible consequences on animal welfare and consumer health, analytical strategies are needed to control the use of STER (used as growth promoting agents) at any point in the animal feeding-stuff production chain [1].

Although there are many analytical approaches using GC-MS described for matrices of animal origin, the applications for aqueous matrices and more in particular for AFWS are rather limited [2, 3]. GC-MS is a powerful technique, although usually the required derivatization step is time-consuming and can constitute a source of inaccuracy [4].

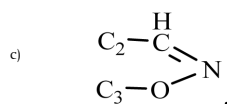
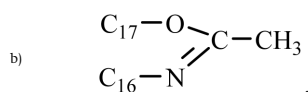
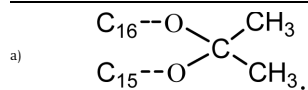
LC isocratic separation with conventional columns is practically unfeasible for complex mixtures as a consequence of the limited available separation space in the chromatogram. The disadvantages of isocratic elution are poor resolution of early solutes and broadening of late-eluting solutes, tailing peaks, and unnecessarily long separation times. All these problems are overcome using gradient elution which offers several advantages: total analysis time can be significantly reduced, global

Correspondence: ■ provide title ■ Roberto Izquierdo-Hornillos, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain
E-mail: hornillo@quim.ucm.es
Fax: +34-913944329

Abbreviations: AAS, anabolics; AFWS, animal feeding water sample; BM, betamethasone; BLS, bolasterone; B, boldenone; CC, corticoids; CL, cortisol; CS, cortisone; CC α , decision limits; CC β , detection capabilities; DZ, danazol; DF, deflazacort; DM, dexamethasone; DMT, methandrostenolone; FLU, flumethasone; FL, fluorocortisone; FM, fluoxymesterone; GM, Gemini C18; HYP, Hypersil ODS; MPL, methylprednisolone; MT, methyltestosterone; NE, norethindrone; NT, 19-nortestosterone; OM, oxymetholone; PL, prednisolone; PS, prednisone; PUR, Purospher Star C18; SF, Synergi Fusion-RP; SM12, Synergi Max-RP C12; STER, steroids; TRA, triamcinolone acetoneide

Table 1. Structures of STER (CC and AAS)


STER	C1–2	C2–3	C5	C6	C7	C9	C11	C16	C17	C19
PL	=						–OH		–COCH ₂ OH	
PS	=						=O		–COCH ₂ OH	
CL							–OH		–COCH ₂ OH	
FL						–F	–OH		–COCH ₂ OH	
CS							=O		–COCH ₂ OH	
MPL	=			–CH ₃			–OH		–COCH ₂ OH	
BM	=					–F	–OH	–CH ₃	b	–COCH ₂ OH
DM	=					–F	–OH	–CH ₃	a	–COCH ₂ OH
FLU				–F		–F	–OH	–CH ₃	–COCH ₂ OH	
FM						–F	–OH		–CH ₃	
TRA ^{a)}	=					–F	–OH		–COCH ₂ OH	
B	=									
DF ^{b)}	=						–OH		–CO-CH ₂ OCH ₃	
NT										–H
DMT	=								–CH ₃	
NE									–COCH	–H
MT									–CH ₃	
BLS					–CH ₃				–CH ₃	
OM	=CHOH in C2		–H						–CH ₃	
DZ ^{c)}	=								–COCH	



resolution increased, peak tailing reduced, and effective sensitivity improved since there is little variation in peak shape. However, the best feature is that it provides maximal resolution in minimal time. Although the gradient programs involve actually only one experimental factor (*e.g.*, organic modifier concentration), there are apparent variables governing the separation such as initial concentration of the organic solvent, time, and profile of the gradient program [5]. Most gradient separations use linear gradients, which are strongly recommended during initial stages of method development. Curved gradients have been used in the past for certain kind of samples, but today have been largely replaced by segmented gra-

dients, providing all the advantages of curved gradients, and also furnish a greater control over separation [6].

An LC separation for mixtures of corticoids (CC) and hydroxytestosterone isomers based on simultaneous changes in temperature and gradient steepness has been reported [7]. LC-MS screening methods using linear gradients for a complex mixture of CC and anabolic STER in horse urine [8] and for detecting ten anabolic STER in muscle tissues [9] have been developed. Another LC-MS method using a segmented gradient for the determination of CC in human urine has also been developed [10]. An LC-TOF-MS method using a segmented gradient for a group of CC in human and animal urine has also been

reported [11]. LC-MS, however, has the disadvantage of being expensive and not available in all laboratories.

Animal feeding water is usually analyzed to avoid a systematic nontherapeutic administration of growth promoters. Several analytical strategies have been reported to monitor STER (estrogens or progestogens) in water based on chromatographic techniques [4, 12]. The LC analysis of traces of STER sex hormones and related synthetic compounds in environmental water has been reported [13]. An LC method for dexamethasone (DM) in feeding water in livestock has been developed and validated [14]. GC-negative chemical ionization-MS screening method for the detection of CC in aqueous preparations (e.g., drinking water or drinking water supplements), commercially available in the “black market”, has been proposed [15].

In the present paper, a gradient separation study for the determination of 20 STER orally active anabolics (AAS) and CC frequently used as growth promoters (structures in Table 1) in AFWS by LC using UV detection and several RP columns has been carried out. In order to obtain information for gradient optimization using these columns, isocratic separations using a mobile phase ACN/H₂O (35:65 v/v) previously described [16] were performed. After sample preparation including SPE, the optimized separation was applied to the analysis of AFWS spiked with STER and a validation study was carried out according to the Council Directive 2002/657/EC decision criteria established for quantitative screening methods [17]. The proposed method was applied to other water samples with satisfactory results.

2 Experimental

2.1 Chemicals

Prednisolone (PL; 11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), prednisone (PS; 17 α ,21-dihydroxy-1,4-pregnadiene-3,11,20-trione), cortisol (CL; 11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione), fluorocortisone (FL; 9 α -fluoro-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione), cortisone (CS; 17 α ,21-dihydroxy-4-pregnene-3,11,20-trione), methylprednisolone (MPL; 6 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), betamethasone (BM; 9 α -fluoro-16 β -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), DM (9 α -fluoro-16 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), fluoxymesterone (FM; 9 α -fluoro-11 β ,17 α -dihydroxy-17-methyl-4-androsten-3-one), flumethasone (FLU; 6 α ,9 α -difluoro-16 α -methyl-11 β ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione), triamcinolone acetonide (TRA; 9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17,21-tetrahydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione-16 β ,17 β -acetonide), boldenone (B; 1,4-androstadien-17 α -ol-3-one), deflazacort (DF; (11 β ,16 α)-21-(acetyloxy)-11-hydroxy-2'-methyl-5'H-pregna-1,4-diene[17,16-d]-

oxazole-3,2-O-dione), 19-nortestosterone (NT; 17 β -hydroxy-19-norandrost-4-en-3-one), methandrostenolone (DMT; 17 β -hydroxy-17 α -methyl-1,4-androstadien-3-one), norethindrone (NE; 19-nor-17 α -ethinyl-4-androsten-17 β -ol-3-one), methyltestosterone (MT; 17-hydroxy-17-methyl-androst-4-en-3-one), bolasterone (BLS; 17-hydroxy-7,17-dimethyl-androst-4-en-3-one), oxymetholone (OM; 17-(hydroxy-2-[hydroxymethylene]-17-methyl-5-(androstan-3-one), and danazol (DZ; 17 β -hydroxy-2,4,17 α -pregnadien-20-yno[2,3-d]isoxazole) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The purity of CL is 92% and for the remainder STER higher than 97%. A stock solution of these analytes (1000 μ g/mL) was prepared in methanol and stored at (20°C for 1 year [18]. A single or a mixture of the STER was prepared daily by diluting the stock solution with methanol and used for different studies.

LC-grade ACN, methanol (MeOH), and diethyl ether (DEE) from Scharlab (Barcelona, Spain), Milli-Q water from Millipore (Molsheim, France), and C₁₈ Bond Elut (3 mL and 500 mg) cartridges from Varian (Harbor City, CA, USA) were also used. Other used chemicals were of analytical reagent grade.

2.2 Apparatus

The chromatographic system consisted of a PU-2089-Plus solvent delivery system provided by an online degasser and a multiwavelength MD-1510 photodiode-array detector (DAD) covering the range of 190–600 nm and interfaced to a computer for data acquisition from Jasco Analítica (Madrid, Spain). A six-port Rheodyne valve with a 20 μ L sample loop injector (Cotati, CA, USA), a Jones-Chromatography block heated series 7960 for thermostating columns in the range of 30–70°C from Seagate Technology (Scotts Valley, CA, USA) were used. The following RP columns were used: a bonded-silica Hypersil ODS (HYP; 250 mm \times 4.6 mm id, 5 μ m), Synergi Max-RP C12 (SM12; 250 mm \times 4.6 mm id, 4 μ m), Synergi Fusion-RP (SF; 250 mm \times 4.6 mm id, 4 μ m) and GM (250 mm \times 4.6 mm id, 5 μ m) from Phenomenex (Torrance, CA, USA), and a Purospher Star C18 (PUR; 250 mm \times 4.6 mm id, 5 μ m) from Merck (Darmstadt, Germany). A vortex mixer Mixo-Tub-30 from Crison (Barcelona, Spain), Millipore 0.45 μ m nylon filters (Bedford, MA, USA), and a Visiprep vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were also used.

2.3 Mobile phases and chromatographic analysis

An isocratic mobile phase ACN/H₂O (35:65 v/v) was obtained by mixing Milli-Q water with ACN by programming the pump. In a similar way, several ACN/H₂O gradient programs were performed. Column re-equilibration (30°C) was done for 7 min at the initial gradient conditions. For optimization purposes, a methanolic solu-

tion containing a single or an appropriate mixture of STER (3 µg/mL) was injected (20 µL). The flow-rate was set up at 1 mL/min and UV absorbance–DAD detection in the 190–360 nm range. Peaks identification and peak purity of STER were performed by comparison of their retention time and UV spectra with those compounds previously registered by injection of each one individually. All STER were monitored at 245 nm (280 nm for OM and DZ) [16].

2.4 Sample preparation

2.4.1 For STER analysis

AFWS were collected from drinking-trough placed in the “Sierra de Guadarrama” (Madrid, Spain): no. 1 (“Virgen del Espino”, Los Molinos); no. 2 (“Cordel del Campuzano”, El Boalo); no. 3 (“Ermita de San Isidro”, El Boalo), and no. 4 (“Fuente Ramiro-Los Tilos”, Collado Mediano) as representatives of an important stockbreeding area. Samples were stored at –20°C until analysis.

A similar extraction procedure as that reported for similar compounds in urine samples has been used [19, 20]. In summary, AFWS (3 mL) [21] was placed in a 10 mL stoppered centrifuge tube and spiked with a STER standard mixture within the 0.033–0.40 µg/mL range and 0.20 µg/mL MPL or TRA as internal standards (IS) and processed through C₁₈ cartridges which had previously been conditioned with MeOH and water. After washing the cartridges with water, the elution of STER was performed using 4 mL DEE. The eluate was evaporated to dryness under nitrogen sparge at 30°C. The dried residue was dissolved using 200 µL MeOH and 20 µL were injected into the LC system. Blank AFWS were previously checked for STER following the above procedure with negative results. The absolute preconcentration factor was 15.

2.4.2 For evaluating extraction efficiencies

Blank AFWS were prepared following the procedure described above. Extraction efficiencies, %E, for STER were assessed using the PUR column, 30°C, and ACN/H₂O gradient to increase 32, 35, 42, 68, and 75% in 0, 10, 14, 18, and 20 min and hold in 75% ACN for 6 min as mobile phase, 1 mL/min flow-rate and two different calibration graphs. The first calibration was obtained by adding standard solutions of STER in the 0.5–6 µg/mL range to the dried residue obtained from blank samples, and the slope, S_1 , was calculated for each compound. A second calibration graph was also obtained from AFWS spiked with STER in the 0.033–0.40 µg/mL range (equivalent to 0.5–6 µg/mL in samples of standards) after applying the above sample preparation procedure, and the corresponding slope, S_2 , was calculated for each compound. %E was calculated using equation $E (\%) = (S_2/S_1) \times 100$. The %E

values obtained for STER were independent of the concentration range used.

3 Results and discussion

3.1 Isocratic elution

The effects of different RP packings such as type A alkyl silica (HYP), type B (PUR, SM12, GM) and polar embedded group (SF) for the separation of 20 STER using ACN/H₂O (35:65 v/v; 30°C) as mobile phase were tested. This mobile phase and HYP, PUR, and SM12 columns were selected because satisfactory results were previously obtained for STER mixtures [16]. GM and SF columns were selected because they have not been used for separating complex mixtures of STER. Moreover, GM is a packing in which during the final stage of silica manufacturing a unique silica-organic layer is grafted. SF column has a polar embedded group (EPG) and a hydrophobic ligand C₁₈ to achieve a balanced selectivity [22].

Figure 1 shows the retention factors (expressed as $\ln k$) versus tested columns plots. The analysis time for these columns was in the range of 40–50 min. OM and DZ have not been considered because they afforded a strong retention ($k > 20$ for all columns). HYP, PUR, and SM12 columns separated 17 STER (the pair PS/CL coeluted). However, GM column separated 14 (PS/CL, CL/FL, and FM/FLU/TRA coeluted) and SF column 13 (PL/PS, CL/FL/CS, BM/DM, and DF/NT coeluted). As an example, in Fig. 2A shows the chromatogram obtained using the PUR column under isocratic elution. To reduce the analysis time, ACN concentration was increased with unsatisfactory results because the early eluted compounds coeluted. Based on retention data, STER were classified into three groups. Group I includes the less retained CC (PL, PS, CL, FL, and CS) mainly due to the substituent in C₁₇ (–COCH₂OH). Group II, includes CC and AAS due to their intermediate polarity (MPL, BM, DM, FM, FLU, TRA, B, DF, NT, and DMT) showing CC less retention than AAS. Group III includes the most retained AAS mainly due to substituents in C₁₇: –CH₃ for MT, BLS and OM, and –C≡H for NE and DZ. PUR and SM12 packings were the most retentive for both hydrophilic CC and hydrophobic AAS compounds. However, HYP packing was the less retentive for all STER. As expected, SF packing achieves a balanced (intermediate) retention with respect to other columns.

Based on above data, a gradient is required and the use of different columns is recommended for achieving the desired resolution [23, 24].

3.2 Gradient elution

The use of temperature and gradient steepness for controlling band spacing and resolution might be assumed to be less effective than other variables such as solvent or

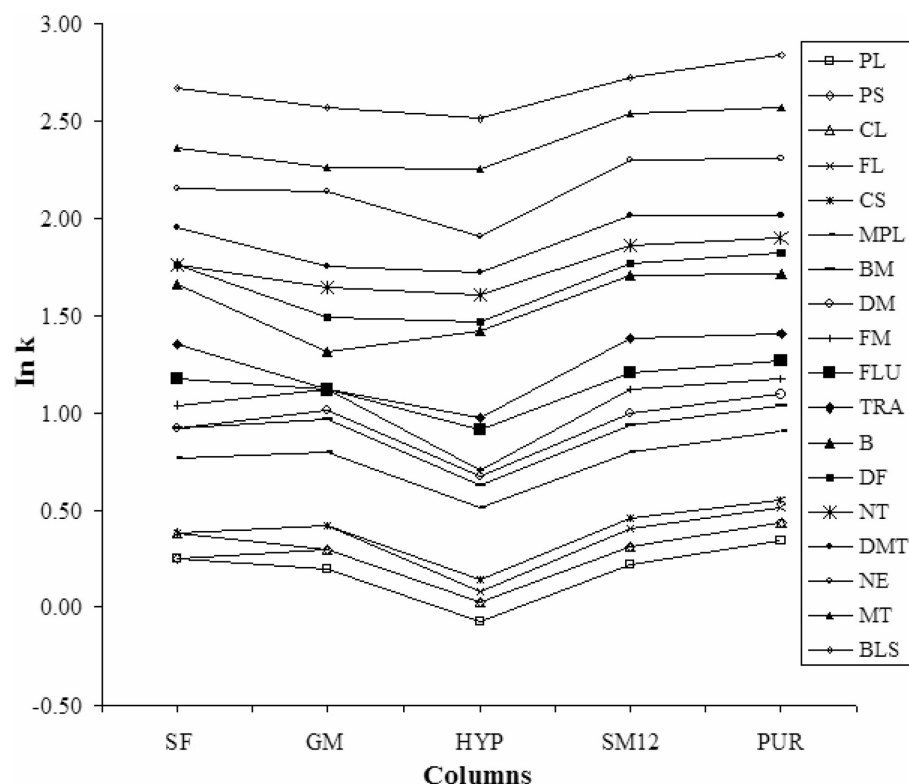


Figure 1. Retention factors ($\ln k$) vs. tested columns for STER using 35% ACN as organic modifier.

column type, because these latter variables are individually better able to alter separation selectivity [23]. Based on this information and taking into account the elution data obtained under isocratic elution (Fig. 1) for the columns tested (e.g., Fig. 2A), a preliminary segmented gradient was designed. A gradient using three slopes 0.3, 1.7, and 3.8% ACN/min was assayed to elute the groups I (CC), II (CC and AAS), and III (AAS), respectively, using standard solutions of these compounds. In other words, the described gradient was expected to increase 32, 35, 45, 60, and 60% ACN in 0, 10, 16, 20, and 34 min, respectively. Using SM12, HYP, and PUR columns, 16 STER were separated in 26, 30, and 33 min, respectively, and using GM and SF columns 15 STER in 33 and 25 min, respectively. To improve resolution and reduce analysis time, several refined gradients for each column were tested. As expected, the optimized gradients were different for each column. Table 2 summarizes the characteristics of the optimal gradients. As can be observed, SM12, HYP, and PUR columns separated 19 STER (the pair PS/CL coeluted), GM column separated 17 (PS/CL, FL/CS, and FM/FLU coeluted) and SF column separated 15 (PL/PS, CL/FL/CS, BM/DM, and B/DF coeluted). Taking into account baseline resolution ($R_s > 1.5$ for bands of similar size), only PUR column separated 18 STER to baseline ($R_s = 0.8$ for CS/FL). SM12, GM, HYP, and SF columns separated 15, 13, 11, and 11 STER to baseline, respectively. The A_s mean values (for $A_s < 1$, the reverse value was considered) follow

the sequence $PUR < GM < HYP < SF < SM12$. These results indicate that the separations performance improved with respect to the preliminary gradient ones and are consistent with those above commented [23].

In summary, based on Table 2 data the most adequate gradient separation was obtained using PUR column (Fig. 2B).

3.3 Analysis of AFWS and method validation

The above optimized separation was applied to the analysis of AFWS spiked with STER after applying the sample preparation procedure. For method validation, sample no. 1 was selected and analyzed as described in Section 2.4.1. The quantitative screening method validation has been carried out according to the Commission Decision 2002/657/EC. For this purpose, eight mandatory performance characteristics for the conventional validation approach were determined: calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits ($CC\alpha$), detection capabilities ($CC\beta$), precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), accuracy, selectivity, and robustness [17].

3.3.1 Calibration graphs, extraction efficiencies, $CC\alpha$, and $CC\beta$

Several STER were tested as IS. MPL and TRA were judged to be the best for quantitation purposes. These com-

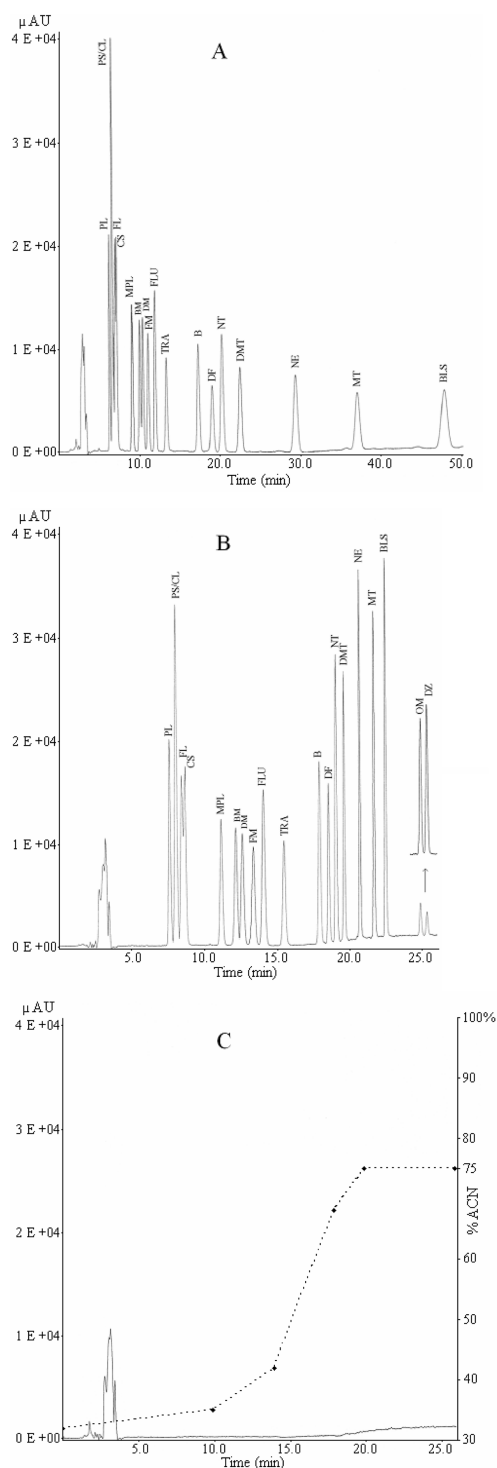


Figure 2. Chromatograms obtained at 245 nm (280 nm for OM and DZ) using a PUR column (30 C) and 1.0 mL/min flow-rate under isocratic elution for a standard mixture of 3 µg/mL STER using 35% ACN as organic modifier (A), and under gradient elution to increase 32, 35, 42, 68, and 75% ACN in 0, 10, 14, 18, and 20 min, respectively holding 6 min 75% ACN: for a standard mixture of 3 µg/mL STER (B) and for a blank AFWS no.1 (C). The above gradient program is illustrated in Fig. 2C.

pounds eluted between CS–BM and FLU–B, respectively and were separated up to baseline. TRA was used as IS for PL, FL, MPL, BM, FLU, B, NT, DMT, DF, NE, MT, BLS, OM, and DZ and MPL for PS, CL, CS, DM, FM, and TRA. Calibration graphs were performed by adding to STER-free AFWS no. 1, standards of STER at six concentration levels in the range of 0.033–0.40 µg/mL using 0.20 µg/mL MPL or TRA as IS, following the procedure described in Section 2.4.1. These mixtures were analyzed using the PUR column (30°C) under ACN/H₂O gradient to increase 32, 35, 42, 68, and 75% ACN in 0, 10, 14, 18, and 20 min, respectively holding 6 min at 75% ACN, a flow-rate of 1 mL/min and UV-absorbance detection at 245 nm (280 nm for OM and DZ). The results were analyzed by linear regression. Plotting each STER peak area to IS ratio (y) versus the concentration ($x = \mu\text{g/mL}$) of each one, the calibration equation $y = A + Bx$ was obtained. The parameters A (intercept), B (slope), and r (regression coefficient) are summarized in Table 3. The errors in the slopes and intercepts do not reveal significant differences. In all cases the intercepts were not significantly different from zero.

Extraction efficiencies, %E, for STER were assessed using calibration graphs according to the procedure described in Section 2.4.2. The values obtained are independent of the concentration used (within the calibration range) and are shown in Table 3.

CC α is defined as the limit at and above which it can be concluded with an error probability of α that a sample is noncompliant and CC β as the smallest content of the substance that may be detected, identified, and/or quantified in a sample with an error probability of β [17]. CC α were evaluated by analyzing 20 blank AFWS and calculating the S/N at the time window in which the analyte is expected. CC α (α error = 1%) were set as three times the S/N (values in Table 3). In the same way, CC β were evaluated by analyzing 20 blank AFWS spiked with STER at the CC α . Once the analytes were identified, CC β (β error = 5%) were set as the value of the CC α plus 1.64 times the SD of the within-laboratory reproducibility of the measure content (Table 3).

3.3.2 Precision and accuracy

The repeatability was examined by analyzing six different mixtures of STER using AFWS spiked with 1.0, 1.5, and 2.0 times CC β concentration and by running each mixture once ($n = 18$), whereas within-laboratory reproducibility was evaluated for three different days ($n = 54$). The mean concentrations and CVs obtained are summarized in Table 4.

Accuracy was assessed by analyzing six different mixtures at three different concentration levels of STER (1.0, 1.5, and 2.0 CC β) by replicate measurements ($n = 18$). Standards of STER were added to AFWS, processed according to sample preparation procedure, and ana-

Table 2. Characteristics of the separations for STER using several RP columns and the optimal gradient program of ACN as organic modifier

Column	SF			GM			HYP			SM12			PUR		
Gradient	Time (min)	%ACN		Time (min)	%ACN		Time (min)	%ACN		Time (min)	%ACN		Time (min)	%ACN	
	0, 10, 20, 25	30, 45, 65, 75		0, 5, 11, 14, 15, 16	35, 35, 45, 68, 68, 95		0, 10, 16, 32, 35, 45, 60, 20			0, 10, 14, 18, 20	32, 35, 43, 70, 75		0, 10, 14, 32, 35, 42, 68, 75, 18, 20		
STER	t_R	A_s	R_s	t_R	A_s	R_s	t_R	A_s	R_s	t_R	A_s	R_s	t_R	A_s	R_s
PL	8.2	0.90	–	6.5	1.07	–	6.5	0.81	–	7.7	1.06	–	7.8	1.02	–
PS	8.2	1.20	–	6.9	1.14	1.6	6.8	0.96	1.1	8.2	0.82	1.5	8.2	1.04	1.7
CL	8.2	1.16	–	6.9	1.10	–	6.8	1.06	–	8.2	1.21	–	8.2	1.08	–
FL	8.6	1.20	0.4	7.4	1.00	1.4	7.1	0.91	0.9	8.5	0.99	1.1	8.6	0.90	1.6
CS	8.6	1.10	–	7.4	1.15	–	7.3	1.26	0.7	8.8	1.10	0.9	8.8	1.15	0.8
MPL	10.1	0.90	2.3	9.4	1.20	5.2	9.2	0.9	6.5	11.1	1.28	7.4	11.4	1.02	7.9
BM	10.7	1.00	0.9	10.4	0.82	3.4	10.0	0.74	1.9	12.1	1.01	3.0	12.4	0.98	2.9
DM	10.7	1.10	–	10.7	1.30	1.0	10.4	0.94	0.8	12.7	1.28	1.5	12.8	1.05	1.6
FM	11.2	1.20	0.6	11.4	0.99	2.0	10.7	1.32	0.7	13.7	1.01	2.6	13.6	1.04	2.1
FLU	11.2	1.10	–	11.4	1.30	–	11.9	0.82	3.0	14.3	1.33	1.7	14.3	1.05	2.2
TRA	11.8	0.90	1.4	12.5	1.07	3.8	12.6	0.87	1.5	15.9	1.40	4.9	15.7	1.01	3.0
B	12.5	0.80	1.7	13.7	1.06	4.1	16.3	0.77	11.4	18.2	0.94	5.5	18.1	1.02	7.8
DF	14.3	0.80	3.4	14.7	0.94	3.7	16.8	1.14	1.1	18.4	1.41	1.2	18.7	1.02	2.7
NT	14.8	1.00	1.1	15.0	0.83	1.2	17.9	0.81	2.9	19.1	1.43	2.8	19.1	1.08	2.4
DMT	15.8	0.84	2.0	15.2	1.21	0.8	18.7	0.85	2.1	19.7	1.44	3.2	19.7	1.08	3.2
NE	16.7	0.82	1.9	16.7	1.16	7.0	20.1	0.81	3.8	20.6	1.35	4.7	20.8	1.08	7.0
MT	18.0	0.88	2.4	17.2	1.24	2.4	22.2	0.87	13.4	21.5	1.41	4.5	21.7	1.16	6.5
BLS	19.5	0.84	3.0	18.0	1.30	4.6	23.4	0.83	4.9	22.3	1.44	4.3	22.5	1.09	4.6
OM	22.6	1.30	5.9	19.3	1.30	8.3	27.6	0.75	13.0	24.3	1.40	9.2	24.9	1.01	12.6
DZ	23.8	0.80	2.5	20.1	0.90	3.8	28.0	0.96	1.2	24.9	1.44	2.4	25.4	1.14	2.0
n	15			17			19			19			19		
n'	11			13			15			11			18		
t_{tot}	25			21			26			29			26		

t_R is the retention time (min); t_{tot} the analysis time (min); A_s the asymmetry factors; n the number of peaks observed in the chromatograms and n' the number of separated compounds to baseline with $R_s > 1.5$. A_s was calculated at 10% of the peak height and R_s with peak width at halfheight.

lyzed using the proposed LC method. Table 4 shows the mean recoveries, %R, obtained.

3.3.3 Selectivity

Selectivity was assessed by a qualitative comparison of the chromatograms obtained from a standard sample (Fig. 2B) and AFWS no. 1: blank (Fig. 2C) following the procedure described in Section 2.4.1. The chromatogram obtained for this sample spiked with STER is the same as that given in Fig. 2B. As can be seen, possible interferences due to the substances present in samples were not observed. In addition, a detection and identification process based on retention times and a DAD was carried out [25]. The RSD ($n = 6$) of the retention times for STER under conditions shown in Fig. 2B were lower than 1% for each one. The UV spectrum of each peak in the chromatogram was stored and subsequently compared with standards. The spectra were normalized and overlaid. Impurities were investigated further by displaying the spectra obtained at different points across the peak with

negative results. Figure 2C chromatogram indicates that this procedure is adequate for STER analysis in AFWS.

3.3.4 Robustness

The robustness study was carried out using the Youden test described in the Council Directive 2002/657/EC [17]. For this purpose minor changes of seven variables in the sample preparation procedure: the operator, several SPE parameters (cartridges age, wash volume, elution volume, and elution mode), temperature and mode of the final evaporation process, were chosen. As shown in Table 5, eight experiments were conducted for the evaluation of seven selected factors by spiking eight AFWS with STER at CC β concentration and processed according to the sample preparation procedure. The effect of a particular variable was estimated by subtracting the mean result obtained with the variable at “high level”, indicated by a capital letter, from the mean result achieved with it at “low level”, indicated with the corresponding small letter (Table 5). For each variable, the calculated dif-

Table 3. Linear regression parameters obtained from calibration graphs using AFWS with STER, and CC α , CC β , and extraction efficiencies (%E) for STER using AFWS

STER	A	$B \times 10^2$	r	CC α ($\mu\text{g/L}$)	CC β ($\mu\text{g/L}$)	%E \pm CV
PL	−0.04	48	0.999	6.7	7.6	98 \pm 3
PS	−0.07	38	0.998	6.7	9.5	93 \pm 4
CL	−0.03	35	0.999	6.7	8.4	100 \pm 3
FL	−0.04	42	0.998	6.7	8.7	99 \pm 4
CS	−0.09	45	0.999	6.7	10.4	97 \pm 3
MPL	−0.03	38	0.998	6.7	9.1	98 \pm 4
BM	−0.02	38	0.999	6.7	8.5	98 \pm 2
DM	−0.07	34	0.999	6.7	8.4	95 \pm 3
FLU	−0.05	36	0.999	10.0	11.8	98 \pm 3
FM	−0.12	51	0.999	6.7	7.5	98 \pm 4
TRA	−0.05	30	0.999	6.7	9.5	94 \pm 3
B	−0.02	49	0.999	6.7	7.9	95 \pm 4
DF	0.00	33	0.998	6.7	8.9	96 \pm 3
NT	0.03	60	0.996	6.7	9.3	101 \pm 3
DMT	−0.02	49	0.999	6.7	9.4	95 \pm 5
NE	−0.07	60	0.999	6.7	8.9	97 \pm 4
MT	−0.01	53	0.999	6.7	9.2	95 \pm 3
BLS	−0.02	65	0.999	6.7	8.5	95 \pm 5
OM	−0.06	29	1.000	10.0	13.4	96 \pm 4
DZ	−0.03	33	0.997	10.0	14.6	100 \pm 3

ference was indicated as D_i and the SD of the differences, S_{D_i} , was calculated by

$$S_{D_i} = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad (1)$$

When S_{D_i} is significantly larger than the SD of the method, it means that all the chosen factors together have an effect on the result.

Following the experimental plan, the results in Table 5 indicate that “operator” is the parameter with the larger difference. Considering this parameter for operator no. 1 (experiments s–v), the mean recoveries obtained were in the range of 90–99% (S in the range of 0.3–6.3%) and for operator no. 2 (experiments w–z) the mean recoveries were in the range of 92–101% (S in the range of 0.3–2.8%). These results demonstrate that all the chosen factors together do not significantly affect the performances of the method.

3.4 Application of the proposed method to other water samples

The proposed method was applied to other AFWS (nos. 2–4) as described in Section 2.4.1. The blanks obtained for these samples were exactly the same as that obtained for AFWS no. 1 (Fig. 2C). Moreover, STER were extracted from these spiked AFWS with similar %E values to those obtained for water no.1. These facts indicate that the proposed method can be applicable to the animal feeding waters cited and probably to many more.

4 Concluding remarks

An LC method for the separation of 20 STER using a Purosphere column has been developed. The optimal condi-

Table 4. Precision and accuracy at different concentration levels of STER^{a)}

STER	Repeatability						Within-laboratory reproducibility						Accuracy %R \pm CV
	CC β	% CV	1.5 CC β	% CV	2 CC β	% CV	CC β	% CV	1.5 CC β	% CV	2 CC β	% CV	
PL	7.4	3.0	10.8	2.3	14.8	2.8	7.4	5.3	10.6	4.4	14.8	3.9	100 \pm 2
PS	8.6	3.5	12.8	3.0	17.0	2.4	8.8	5.7	12.8	3.7	17.2	2.9	99 \pm 2
CL	8.0	3.8	12.6	2.3	16.6	2.4	8.2	6.2	12.6	3.5	16.6	3.3	99 \pm 2
FL	8.8	3.2	12.8	2.3	17.4	2.3	8.8	4.2	12.8	3.4	17.4	3.5	100 \pm 3
CS	10.2	5.5	15.0	3.0	19.8	2.0	10.0	6.0	15.0	3.8	20.0	2.8	99 \pm 2
MPL	8.8	3.6	13.2	3.2	17.8	2.3	9.0	5.3	13.4	3.6	17.8	2.8	100 \pm 2
BM	8.2	3.7	12.4	2.7	16.8	2.8	8.2	4.4	12.4	3.8	16.6	3.5	100 \pm 2
DM	8.0	4.5	11.4	3.8	15.4	3.0	8.0	5.4	11.6	4.1	15.4	4.0	99 \pm 3
FLU	11.6	3.0	16.8	2.1	23.4	2.7	11.6	4.7	17.0	3.1	22.8	3.1	99 \pm 3
FM	7.2	2.6	10.8	3.7	14.4	3.0	7.2	5.6	10.8	4.0	14.4	3.9	100 \pm 2
TRA	9.0	2.7	13.0	2.5	17.6	2.8	8.8	6.6	13.0	3.4	17.4	3.9	99 \pm 2
B	7.4	3.2	11.2	2.5	15.2	2.3	7.4	6.7	11.2	3.6	15.0	3.1	100 \pm 2
DF	8.6	3.4	13.2	2.9	17.0	2.2	8.6	6.4	13.0	3.7	17.2	3.5	99 \pm 3
NT	8.8	3.3	13.8	2.6	18.6	2.5	9.2	4.9	14.0	3.7	18.6	3.4	100 \pm 4
DMT	9.2	3.4	13.0	3.2	17.8	2.8	9.0	4.7	13.2	3.3	17.8	3.3	100 \pm 2
NE	8.6	3.1	12.6	2.7	16.8	2.4	8.6	5.6	12.6	3.3	17.0	3.1	100 \pm 3
MT	8.2	3.9	13.2	4.3	17.6	2.8	8.2	5.1	13.0	4.7	17.2	3.7	100 \pm 3
BLS	8.0	3.7	12.0	4.2	16.2	2.1	8.2	5.6	12.2	4.3	16.2	3.5	100 \pm 2
OM	12.4	3.2	18.8	3.0	25.6	2.4	12.8	4.9	19.0	3.9	25.6	2.8	100 \pm 4
DZ	14.0	4.3	22.0	3.4	28.8	2.9	14.2	5.8	21.8	4.6	28.6	4.3	100 \pm 3

^{a)} CC β ((g/L).

Table 5. Youden robustness test: variables and their levels in the experimental design and results obtained for AFWS spiked with STER

(A)

Selected variable	Experiment no.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Operator	A	A	A	A	a	a	a	a
SPE age	B	B	b	b	B	B	b	b
SPE wash	C	c	C	c	C	c	C	c
SPE elution mode	D	D	d	d	d	d	D	D
SPE elution volume	E	e	E	e	e	E	e	E
Final extract evaporation temperature	F	f	f	F	F	f	f	F
Final extract evaporation mode	G	g	g	G	g	G	G	g
Observed results	s	t	u	v	w	x	y	z

(B)

Selected variable	Units	Abbreviation ^{a)}	High level	Low level
Operator	–	A,a	1	2
SPE age	–	B,b	Old	New
SPE wash	mL	C,c	7	5
SPE elution mode	–	D,d	Always wet ^{b)}	To dryness ^{c)}
SPE elution volume	mL	E,e	4.5	3.5
Final extract evaporation temperature	°C	F,f	50	40
Final extract evaporation mode	–	G,g	To dryness	To dryness + 5 min

(C)

Variable	Differences (%)
Operator	8.2
SPE age	4.2
SPE wash	3.3
SPE elution mode	4.0
SPE elution volume	4.0
Final extract evaporation temperature	3.5
Final extract evaporation mode	4.1

^{a)} Upper and lower case letters represent high and low level values of the variable, respectively.

^{b)} Cartridge was maintained wet all stages during the cleanup process.

^{c)} The cartridge was left to dry for 1 min after sample application.

tions were 30°C, an ACN/H₂O gradient (to increase 32, 35, 42, 68, and 75% in 0, 10, 14, 18, and 20 min, respectively and hold in 75% ACN for 6 min) as mobile phase, UV–DAD detection at 245 nm (280 nm for OM and DZ) and

1 mL/min flow-rate. Under these conditions 19 STER out of 20 were separated (18 up to baseline) in 26 min with R_s and A_s values in the ranges of 0.8–12.6 and 0.90–1.16, respectively. After sample treatment using C₁₈ cartridges, the described method was validated in AFWS no. 1 spiked with STER, according to the Commission Decision 2002/657/EC [17]. Eight mandatory performance characteristics (calibration curves, extraction efficiencies, CC α , CC β , accuracy, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), robustness, and selectivity) were determined for quantitative screening purposes. The proposed method was found to be applicable to different kind of animal feeding water.

This work was supported by Project (07G/047.1/2003; Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid) (CM). R. Gonzalo-Lumbreras thanks CM for a post-doc grant associated to this project, R. Muñoz-Valencia thanks CONACyT-México for a grant.

5 References

- [1] Commission of the European Communities, Council Directive 96/23/EC, *Off. J. Eur. Commun.* 1996, L125, 10.
- [2] Kootstra, P. R., Zoontjes, P. W., van Tricht, E. F., Sterk, S. S., *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 82–92.
- [3] Nielsen, M. W. F., Lasaroms, J. J. P., Essers, M. L., Sanders, M. B., Heskamp, H. H., Bovee, T. F. H., van Rhijn, J., Groot, M. J., *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 30–34.
- [4] Petrovic, M., Eljarrat, E., López de Alda, M. J., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2002, 974, 23–51.
- [5] Torres-Lapasió, J. R., García-Álvarez-Coque, M. C., *J. Chromatogr. A* 2006, 1120, 308–321.
- [6] Snyder, L. R., Glajch, J. L., Kirkland, J. L., *Practical HPLC Method Development*, 2nd Edn., Wiley and Sons Inc., New York 1997.
- [7] Dolan, J. W., Snyder, L. R., Djordjevic, N. M., Hill, D. W., Saunders, D. L., Van Heukelem, L., Waeghe, T. J., *J. Chromatogr. A* 1998, 803, 1–31.
- [8] Ho, E. M., Leung, D. K. K., Wan, T. S. M., Yu, N. H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1120, 38–53.
- [9] Xu, C. L., Chu, X. G., Peng, C. F., Jin, Z. Y., Wang, L. Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 616–621.
- [10] Spyridaki, M. H., Kiouisi, P., Vonaparti, A., Valavani, P., Zonaras, V., Zahariou, M., Sianos, E., Tsoupras, G., Georgakopoulos, C., *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 242–249.
- [11] Touber, M. E., Engelen, M. C., Georgakopoulos, C., van Rhijn, J. A., Nielsen, M. W. F., *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 137–146.
- [12] López de Alda, M. J., Díaz-Cruz, S., Petrovic, M., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2003, 1000, 503–10526.
- [13] Almeida, C., Nogueira, J. M. F., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1303–1311.
- [14] Reig, M., Mora, L., Navarro, J. L., Toldrá, F., *Meat Sci.* 2006, 74, 676–680.
- [15] Noppe, N., Verheyden, K., Gillis, W., Courtheyn, D., Vanthem-sche, P., De Brabander, H. F., *Anal. Chim. Acta* 2007, 586, 22–29.
- [16] Gonzalo-Lumbreras, R., Muñoz-Valencia, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. A* 2007, 1156, 321–330.
- [17] Commission of the European Communities, Council Directive 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.* 2002, L221, 8.
- [18] Gaillard, Y., Vayssette, F., Ballant, A., Pépin, G., *J. Chromatogr. B* 1999, 735, 189–205.

- [19] Santos-Montes, A., Gonzalo-Lumbreras, R., Gasco-Lopez, A. I., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. B* 1994, 652, 83–89.
- [20] Gonzalo-Lumbreras, R., Pimentel-Trapero, D., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. B* 2001, 754, 419–425.
- [21] Stolker, A. A. M., Schwillens, P. L. W. J., van Ginkel, L. A., Brinkman, U. A. Th., *J. Chromatogr. A* 2000, 893, 55–67.
- [22] *Phenomenex Catalog for Chromatographic Columns and Supplies*, Torrance, CA, USA 2005–2006.
- [23] Dolan, J. W., Snyder, L. R., Saunders, D. L., Van Heukelem, L., *J. Chromatogr. A* 1998, 803, 33–50.
- [24] Jandera, P., *J. Chromatogr. A* 1999, 845, 133–144.
- [25] Logan, B. K., *Anal. Chim. Acta* 1994, 288, 111–122.

III.6

Desarrollo y validación de un método por GC-MS para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso

Aceptado en el Journal Separation Science (2-12-2007)

Nº registro JSSC-2007-00513

III.6.1. Introducción

El control del uso de EAA administrados a animales para consumo humano se basa generalmente en el análisis de muestras biológicas. Sin embargo, el pienso y agua de consumo animal han sido propuestos como matrices alternativas para el control de esteroides oralmente activos en algunos países [1].

Para determinar y prevenir el uso de esteroides se requieren métodos eficientes y fiables. Éstos se dividen en dos categorías: de criba y confirmación. El objetivo de los métodos criba es encontrar y seleccionar muestras sospechosas para su posterior confirmación [2].

Para determinar esteroides en una gran variedad de muestras tales como carne, sitios de inyección, hígado, grasa, orina, excremento; se han desarrollado varios tratamientos de muestra usando ELL y/o EFS [3]. Sin embargo, hay muy poca literatura acerca de muestras de pienso. La boldenona se ha determinado mediante un método de LC-MS en pienso para terneros mediante ELL con acetato:MeOH, EFS (C_{18} y $-NH_2$) y fraccionamiento en una columna C_{18} utilizando LC [4]. La metiltestosterona se ha determinado mediante LC-MS y LC-UV en pienso para peces utilizando ELL con Hex:MeOH:H₂O y EFS (poliméricos) [5].

El presente trabajo consistió en el desarrollo y validación de un método por GC-MS para la determinación de una mezcla compleja de EAA oralmente activos en muestras de pienso para lechones usando una columna Zebron ZB-5, un flujo de 1.5 mL/min, testosterona como patrón interno y como agente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida. El método propuesto incluyó la optimización de la separación y preparación de muestra. La separación óptima se consiguió usando un gradiente de temperatura, permitiendo la separación de los EAA en un tiempo de análisis de 18 min. El tratamiento de muestra incluye una lixiviación con ACN, saponificación mediante una disolución binaria NaOH:MgCl₂ y ELL con AcEt. La validación del método se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por la UE para métodos cuantitativos de confirmación tales como selectividad, linealidad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad, robustez, exactitud [6]. Finalmente, el método se aplicó a nueve tipos de pienso para distintos animales con resultados satisfactorios.

Referencias

- [1] O. Huetos, M. Ramos, M. Martín de Pozuelo, M. San Andrés, T.B.A. Reuvers, **Analyst**, 124 (1999) 1523.
- [2] L.K. Amundsen, J.T. Kokkonen, S. Rovio, H. Sirén, **J. Chromatogr. A**, 1040 (2004) 123.
- [3] M. Van Puymbroeck, L. Leyssens, D. Vanderzande, J. Gelan, J. Raus, **Analyst**, 123 (1998) 2449.
- [4] M.W.F. Nielen, P. Rutgers, E.O. Van Bennekom, J.J.P. Lasaroms, J.A. Van Rhijn, **J. Chromatogr. B**, 801 (2004) 273.
- [5] A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. B**, 721 (1999) 197.
- [6] Commission of EC. Council Directive 2002/657/EC. **Off. J. Eur. Communities**, L221 (2002) 8.

02-Dec-2007.

Dear Prof. Izquierdo-Hornillos:

Thank you for submitting your revised manuscript entitled "GC-MS METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR ANABOLIC STEROIDS IN FEED SAMPLES" to the Journal of Separation Science. **It is a pleasure to accept your manuscript in its current form for publication.**

Thank you for your fine contribution.

Best regards,

Prof. Frantisek Svec
Editor-in-Chief, Journal of Separation Science
fsvec@lbl.gov

GC-MS METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR ANABOLIC STEROIDS IN FEED SAMPLES

Roberto Muñiz-Valencia¹, Silvia G. Ceballos-Magaña¹, Raquel Gonzalo-Lumbreras¹, Ana Santos-Montes², Roberto Izquierdo-Hornillos^{1*}.

¹ Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

² Departamento de Ingeniería Mecánica. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad Pontificia Comillas. Alberto Aguilera 25, 28015 Madrid, Spain.

Running title: GC-MS quantitative screening method for steroids in feed samples

Corresponding author:

R. Izquierdo-Hornillos (Ph. D.). Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain.

e-mail: hornillo@quim.ucm.es.

Tel: + (34) 913944365; Fax: + (34) 913944329.

Abbreviations: AAS, androgenic anabolic steroids; BLS, bolasterone; B, boldenone; DHEA, dehydroepiandrosterone; DMT, methandrostenolone; MT, methyltestosterone; NE, norethindrone; NT, 19-nortestosterone; T, testosterone; LLE, liquid-liquid extraction; CC α , decision limits; CC β , detection capabilities.

Abstract

A GC-MS method for the determination of AAS used as growth promoting agents using selected ion monitoring in piglet feed samples has been developed and validated, using testosterone as internal standard. The formation of volatile steroid derivatives was carried out by derivatization with *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide. The optimum separation was achieved using a Zebron ZB-5 column under a gradient temperature elution, allowing the separation of steroids in 18 min. The required sample treatment process was discussed. A leaching using acetonitrile, saponification using a binary NaOH/MgCl₂ solution and LLE using ethyl acetate were finally selected. Method validation has been carried out according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria established for quantitative confirmatory methods. The extraction efficiencies, CC α and CC β for these compounds were in the ranges 78-98%, 10-21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 18-35 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The repeatability and the within-laboratory reproducibility at 1, 1.5 and 2 CC β concentration levels were smaller than 8.2, 7.5 and 5.8% and 12.2, 9.5 and 7.5%, respectively. Accuracy was in the 99-103% range. The robustness was evaluated using the Youden robustness test. The proposed method was applied to the analysis of steroids spiked in different kind of animal feed samples with satisfactory results.

Keywords: anabolic steroids; growth promoting agents; derivatization; animal feed.

1. Introduction

Anabolic androgenic steroids (AAS) are derived from the natural male hormone testosterone (T). Alkylation of T in the 17 α position results in derivatives that are orally active (e.g. methyltestosterone), and removal of the 19-methyl group improves the anabolic to androgenic ratio (e.g. nandrolone). Anabolic steroids determine the development and distribution of muscle and fatty tissue and have an influence on meat tenderness parameters such as the collagen level and solubility. Because of their growth promoting effects, steroid sex hormones are administered to increase the weight gain of animals. In the EU and other countries, the use of hormones for animal fattening is banned since 1988. However, the use of these compounds continues in order to produce meat that is more appealing to consumers because of its juicy and lean look. To prevent possible consequences on animal welfare and consumer health, analytical strategies are needed to control the use of steroids (used as growth promoting agents) at any point in the animal feeding-stuff production chain [1-4].

The control on the use of anabolic agents in meat producing animals (usually performed in slaughterhouses or in farms) is generally based on urine, faeces or hair analysis. The determination of these residues in matrices of biological origin indeed is very complex, e.g. some compounds are strongly metabolized and the metabolites might be still unknown or their standards not available [5]. Feed samples and animal feeding water have also been proposed as alternative matrix to control steroids (parent compounds orally administered) in few countries [2]. So, boldenone and methyltestosterone residues have been determined in feed samples for veal calves [6] and fish [7], respectively.

Sample preparation techniques have been developed to determine steroid residues for a variety of samples such as meat, injection sites, kidney fat, urine and faeces, based mainly on liquid-liquid extraction (LLE) and/or solid phase extraction (SPE) [8]. However, the literature about feed samples is scarce. Methyltestosterone was extracted from fish feed using LLE (hexane/MeOH-water) and SPE (polymeric cartridges) and further LC using UV and MS detection [7]. Boldenone has also been determined in feed samples for veal calves by a leaching process using acetate buffer:MeOH, SPE using C₁₈ and NH₂ cartridges and LC fractionation of the extracts on a C₁₈ column before LC-MS-MS analysis [6]. A LC-UV method for anabolics and corticoids in piglet feed samples including a leaching process using diethyl ether and SPE using silica cartridges has also been reported [9].

Many methods for anabolic compounds have been developed using GC-MS prior derivatization, providing good sensitivity and sufficient specificity for use as confirmatory technique [10, 11]. Anabolic steroids and some metabolites have been analyzed in human urine by GC-MS in full scan mode and validated for qualitative analysis [12]. GC-MS multi-residue methods for the detection of anabolic AAS in biological samples [13-15] have also been developed, validated and integrated into the quality system of the laboratory. However, currently GC-MS methods for steroids in feed samples were not found in the literature. LC-MS has the advantage of eliminating problems associated with the derivatisation steps of GC-MS, and can be a robust, easy and sensitive alternative for nortestosterone in tissues and for the screening of steroids including boldenone [16, 17] in urine. Unfortunately, LC-MS is expensive and not available in all laboratories. The drug concentrations in feed are usually much higher than in animal

tissues. In this way, the methods to be developed for the analysis of AAS in feed should allow detection at levels as low as 1-10 mg kg⁻¹ [18].

In the present paper, a GC-MS method for the determination in piglet feed samples of a complex mixture of the most common AAS orally active used (structures in Table 1), is described. The proposed method includes the preparation and analysis of AAS derivatives and sample preparation, prior to GC-MS, including a leaching process using acetonitrile, saponification using a binary NaOH/MgCl₂ solution and LLE using ethyl acetate. The proposed method was validated according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria established for quantitative confirmatory methods and applied successfully to different kinds of feed samples spiked with these compounds.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Boldenone (B) (1,4-androstadien-17 β -ol-3-one), bolasterone (BLS) (17-hydroxy-7,17-dimethylandro-4-en-3-one), dehydroepiandrosterone (DHEA) (5-androsten-3 β -ol-17-one), norethindrone (NE) (19-nor-17 α -ethinyl-4-androsten-17 β -ol-3-one), 19-nortestosterone (NT) (17 β -hydroxy-19-norandro-4-en-3-one), methandrostenolone (DMT) (17 β -hydroxy-17 α -methyl-1,4-androstadien-3-one), methyltestosterone (MT) (17-hydroxy-17-methylandro-4-en-3-one), testosterone (T) (17 β -hydroxy-4-androsten-3-one), *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), 2,3-dihydroxybutane-1,4 dithiol (DTE) and ammonium iodide (NH₄I), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

LC-grade methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (AcEt), and diethyl ether (DEE) (Scharlab, Barcelona, Spain) and Milli-Q water (Millipore, Molsheim, France) were used. Sodium hydroxide pure and magnesium chloride of analytical reagent grade from Merck (Darmstadt, Germany), Nylon filters (0.45 μ m) from Millipore (Bedford, MA, USA), C₁₈ Bond Elut (3 mL and 500 mg) and Si Bond Elut (3 mL and 500 mg) cartridges from Varian (Harbor City, CA, USA) were also used. A vortex mixer Mixo-Tub-30 from Crison (Barcelona, Spain) and a Visiprep vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were also used. Other used chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Apparatus

Chromatographic analysis was carried out using a GC-8000 series fitted with a split/splitless injector and a Trio 1000 mass spectrometer detector from Fisons Instruments (Milano, Italy). Helium was used as carrier gas at 1.5 mL min⁻¹ flow-rate. The steroid derivatives (AAS-TMS) were separated on a 5% phenyl-95% dimethyl-polysiloxane [30 m x 25 mm I.D., 0.25 μ m (d_f)] Zebron ZB-5 capillary column from Phenomenex (CA, USA). The temperatures of injector and detector were 230 °C and 300 °C, respectively. Injection was made in split (1:10) mode. The GC-MS interface was set at 250 °C. The mass detector was operated in the electron impact mode at 70-eV. Identification and quantitation was performed in full scan mode in the 50 to 450 mass/charge (m/z) range and under selective ion monitoring (SIM) mode, respectively.

2.3. Sample preparation

2.3.1. Derivatization of standards

Ten milligrams of each AAS standard (including T as IS) were accurately weighted and dissolved in 10 mL MeOH ($1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$) and 0.25 mL aliquots of these solutions were diluted to 10 mL using MeOH ($25\ \mu\text{g mL}^{-1}$) and stored at $-20\ ^\circ\text{C}$.

Several volumes of AAS standard solutions were evaporated to dryness and treated with 50 μL of the derivatisation reagent (DR) in a reaction tube to obtain trimethylsilyl derivatives (TMS). The DR composition used was MSTFA: NH_4I :DTE (1000:4:2, v/w/w). These mixtures were mixed thoroughly using a vortex mixer, heated at $60\ ^\circ\text{C}$ for 20 min and the resulting solutions analyzed by GC-MS ($0.5\text{--}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ of AAS-TMS). This DR was chosen due to the speed, safety and quantitativity of the reaction [19].

2.3.2. For feed analysis

Animal feed for piglets was kindly supplied from Nutral (Madrid, Spain) with the following composition in w/w units: humidity (7.6%), protein (20.9%), fat (7.0%), fiber (2.1%), ashes (5.7%), Ca (0.62%) and P (0.46%).

Prior to GC-MS analysis, sample preparation as shown in Fig. 1, consisted of four main steps (leaching of the mixture feed-AAS using ACN, saponification of the fat leached, LLE of the AAS and further derivatization). For this purpose, several volumes from a methanolic solution ($25\ \mu\text{g mL}^{-1}$) of compounds under study were evaporated to dryness ($0.025\text{--}2.5\ \mu\text{g}$ range), including T as IS ($1.25\ \mu\text{g}$), in a 10 mL stoppered centrifuge tube. The residue was mixed with homogenized feed sample (1 g) and the mixture was leached with 4 mL ACN by shaking for 3 min and further centrifuged for 10 min at 3700 g. The ACN phase was removed from the mixture, filtered (nylon filters) and evaporated to dryness under nitrogen sparge. The residue was saponificated using 3 mL $0.33\ \text{M NaOH}/0.33\ \text{M MgCl}_2$ (by mixing 2 mL $0.5\ \text{M NaOH}$ and 1 mL $1\ \text{M MgCl}_2$) at $60\ ^\circ\text{C}$ for 30 min. After centrifugation of the mixture at 3700 g for 10 min, the supernatant was removed, filtered and then AAS were extracted using 4 mL AcEt by mixing for 3 min and further centrifuged for 10 min at 3700 g. The AcEt phase was evaporated to dryness at $40\ ^\circ\text{C}$ under nitrogen sparge and finally AAS were derivatized using 50 μL of DR following the procedure described in 2.3.1. section.

Blank feed samples were previously checked for AAS following the above procedure with negative results.

For real samples analysis a methanolic solution of IS was evaporated to dryness and the residue was treated in the same way that the procedure above described.

2.3.3. For AAS extraction efficiencies

Blank samples were prepared following the procedure described above. Extraction efficiencies, % E, for AAS were assessed using two different calibration graphs. The first calibration was obtained adding to the AcEt phase obtained from blank samples standard solutions of AAS in the $0.5\text{--}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ range (equivalent to $0.025\text{--}2.5\ \text{mg kg}^{-1}$) including T as IS ($25\ \mu\text{g mL}^{-1}$), evaporating the mixture to dryness and

derivatizing the residue as described in 2.3.1 section, and the slope, S_1 , was calculated for each AAS. A second calibration graph was also obtained from feed samples spiked with AAS in the 0.025-2.5 mg kg⁻¹ range including T as IS (1.25 µg kg⁻¹), using the procedure described in 2.3.2 section, and the corresponding slope, S_2 , was calculated for each AAS. The % E were calculated using equation $E (\%) = (S_2/S_1) \times 100$. The % E values obtained for AAS were independent of the concentration range used.

3. Results and discussion

3.1 Analysis of AAS-TMS derivatives

After testing several oven temperature programs and taking into account analysis time and resolution, column was initially maintained at 200 °C for 1 min; subsequently, the temperature was increase to 240 °C (10 °C/min, 5 min hold) and then increased to 300 °C (7 °C/min, 1 min hold). Testosterone (T) was selected as internal standard (IS) for quantitation purposes because is not orally administered. Fig. 2 shows the chromatogram of the optimum separation achieved and mass spectra of AAS-TMS. As can be seen, T eluted between B and NE and was separated up to baseline. Table 2 lists the retention times (t_r), resolution (R_s) calculated with peak width at half-height, molecular weight of AAS-TMS and the selected ions for the determination of AAS.

The AAS were identified and quantified on the basis of retention times and mass spectrum, according to the Commission Decision (2002/657/EC) criteria. Mass spectral library data from NIST-98 and Wiley 6th Ed. were used. Standards and samples were injected and analyzed under the same conditions.

3.2. Extraction of AAS from feed samples and clean-up

The analysis of steroids in feed samples generally is not an easy task due to the diversity and age of farm animals (a plethora of feeds with variable composition are commercially available or homemade) requiring then complex sample preparation procedures [6-7]. For this purpose, DCM, AcEt, DEE and ACN were tested to leach AAS from the matrix. The dry extracts were derivatized and the chromatograms obtained indicate the presence of AAS and interferences mainly due to fatty acids from seeds contained in piglet feed samples such as myristic, rinoletic, oleic, lauric, palmitic, palmitoleic, stearic, decanoic, phthalic, nonanoic, capric, araquidic and linoleic. In order to eliminate these interferences a clean up procedure using silica cartridges (Si) was tested [9]. These assays indicate that ACN extract results in cleaner chromatograms. Nevertheless, interferences were still detected. For clean-up purposes, LLE or SPE using C₁₈ cartridges were considered. Before applying a clean-up process, the ACN extract was evaporated to dryness and then diluted with 6 mL water. The LLE extract and the SPE eluate using AcEt was not enough clean because it was still oily and not adequate for the analysis of AAS. Prior to LLE or SPE and to increase selectivity, a saponification process was carried out. A binary NaOH/MgCl₂ solution were added to the dry residue obtained from ACN extract to precipitate the fat leached along with the AAS [20]. The most favorable results obtained, using this new sample treatment, indicate that a leaching-saponification-LLE procedure was adequate for piglet feed samples analysis spiked with AAS.

3.3. Validation of the chromatographic method in piglet feed samples

The above optimized method was applied to the analysis of piglet feed samples spiked with AAS before applying the sample preparation procedure (2.3.2. section). The quantitative confirmatory method validation has been carried out according to the Commission Decision 2002/657/EC. For this purpose, eight mandatory performance characteristics for the conventional validation approach were determined: calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits, detection capabilities, accuracy, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), robustness and selectivity/specificity [21].

3.3.1. Calibration graphs, extraction efficiencies, decision limits and detection capabilities

Calibration graphs were performed by adding to AAS-free piglet feed samples, standards of AAS at eight concentration levels in the 0.025-2.5 mg kg⁻¹ range using 1.25 mg kg⁻¹ T (IS), following the procedure described in 2.3.2. section. The resulting samples were analyzed under the conditions described in 2.2. section and the results analyzed by linear regression. Plotting each AAS peak area to IS ratio (y) vs. the concentration (x = mg kg⁻¹) of each one, the calibration equation $y = A + Bx$ was obtained. Table 3 summarizes the parameters A (intercept), B (slope) and r (regression coefficient). The errors in the slopes and intercepts do not reveal significant differences.

Extraction efficiencies, % E, for AAS were assessed using calibration graphs according to the procedure described in 2.3.3. section. The values obtained are shown in Table 3.

Decision limit (CC α) is defined as the limit at and above which it can be concluded with an error probability of α that a sample is non-compliant and detection capability (CC β) as the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β [21]. CC α were evaluated by analyzing 20 blank piglet feed samples and calculating the signal to noise ratio at the time window in which the analyte is expected. CC α (α error = 1%) were set as three times the signal to noise ratio (values in Table 3). In the same way, CC β were evaluated by analyzing 20 blank piglet feed samples spiked with AAS at the decision limits. Once the analytes were identified, CC β (β error = 5%) were set as the value of the decision limit plus 1.64 times the standard deviation of the 20 spiked blank at CC α concentration (Table 3).

3.3.2. Precision and accuracy

The repeatability was examined by analyzing six different mixtures of AAS using piglet feed samples spiked with AAS equivalent to 1, 1.5 and 2 times CC β concentration and by running each mixture once (n = 18), whereas within-laboratory reproducibility was evaluated for three different days (n = 54). The mean concentrations and CVs obtained are summarized in Table 4.

Accuracy was assessed by analyzing six different mixtures at three different concentration levels of AAS (1.0, 1.5 and 2.0 CC β) by replicate measurements (n = 18). Standards of AAS were added to feed samples, processed according to sample preparation procedure (2.3.2. section), analyzed using the proposed GC-MS method and their concentrations calculated from calibration graphs described in 3.3.1. Table 4 shows the mean recoveries, % R, obtained for AAS.

3.3.3. Selectivity/specificity

It was evaluated by comparing the chromatogram previously registered from a standard mixture of AAS ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fig. 2) with those obtained from twenty piglet feed blank samples (Fig. 3A) under GC-MS conditions described in 2.2. and 3.1 sections and following the procedure described in 2.3.2. section. In general, as can be seen in Fig. 3 no matrix interferences were detected at the t_r of the analytes for the ions monitored (Table 2). However, only an unknown peak appeared close to the t_r of testosterone (IS). The signal of this interference compared with the IS signal was no significant for quantitation purposes. As expected, the chromatogram obtained from a piglet feed sample spiked with AAS (1.25 mg kg^{-1}) (Fig. 3B) shows a great similarity with that obtained from a standard mixture of AAS. These results indicate that the proposed sample preparation procedure is adequate for the analysis of AAS under study in piglet feed samples.

3.3.4. Robustness

The robustness study was carried out using the Youden test recommended in the Council Directive 2002/657/EC [21]. For this purpose minor changes of seven variables in the sample preparation procedure: operator, leaching volume, saponification-volume, saponification-temperature, LLE volume, final extract evaporation temperature and derivatization-time were chosen. As shown in Table 5, eight experiments were conducted for the evaluation of seven selected factors by spiking eight piglet feed samples with AAS at CC β concentration and processed according to sample preparation procedure. The effect of a particular variable was estimated by subtracting the mean result obtained with the variable at “high level”, indicated by a capital letter, from the mean result achieved with it at “low level”, indicated with the corresponding small letter (Table 5). For each variable, the calculated difference was indicated as D_i and the standard deviation of the differences, S_{D_i} , was calculated by Ec. 1:

$$S_{D_i} = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad \text{Ec. 1}$$

When S_{D_i} is significantly larger than the standard deviation of the method, it means that all the chosen factors together have an effect on the result.

Following the experimental plan, the results in Table 5 indicate “Saponification-temperature” is the parameter with the larger difference. Regarding this parameter for 35°C (experiments S,T,Y,Z), the mean recoveries obtained were in the range 93-99% (S in the range 2.5-8.1 %) and for 25°C (experiments U-X) were in the 89-102% (S in the range 3.9-6.3 %). These results demonstrate that all the chosen factors together do not significantly affect the method performances.

3.4. Application of the developed and validated method to other kind of feed

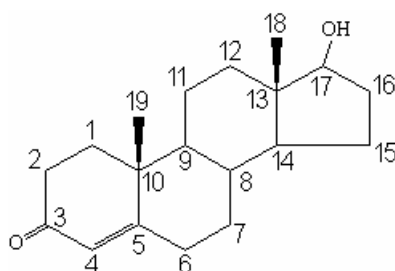
The proposed method was applied in triplicate to other feed samples supplied by NUTRAL S.A. under GC-MS conditions described in 2.2. section. Table 6 shows the feeds composition under study as well as their application. The blanks obtained for these feeds are very similar to those obtained for the feed studied herein (Fig. 3B). Moreover, the AAS were extracted from these spiked feed with similar %E values to those obtained for piglet feed. These facts indicate that the proposed method can be applicable to the feeds cited and probably to many more.

4. Conclusions

A GC-MS method for the separation of seven AAS used as growth promoting agents has been developed. After derivatization using *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide to form the TMS derivatives, the optimized conditions allows the separation of AAS in 18 min with R_s values in the 0.9-11.8 range using a Zebron ZB-5 capillary column. After optimizing the sample treatment process, a leaching process using ACN followed of saponification using a binary NaOH/MgCl₂ solution and liquid-liquid extraction using AcEt, resulted in extracts clean enough for injection in the GC-MS system. The described method was further validated for quantitative confirmatory purposes in piglet feed samples spiked with AAS, according to the Commission Decision 2002/657/EC [21]. For this purpose, eight mandatory performance characteristics (calibration curves, extraction efficiencies, decision limits, detection capabilities, accuracy, precision (repeatability, within-laboratory reproducibility), selectivity and robustness) were determined. This sample treatment found to be applicable to different kinds of animal feed samples.

This work has been supported by Project (07G/047.1/2003 (Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid) (CM). R. Gonzalo-Lumbreras thanks CM for a post-doc grant associated to this project, R. Muñoz-Valencia and S. G. Ceballos-Magaña thanks CONACyT-México for a grant and the authors also thank A. Cubedo of Nutral for supplying feed samples.

Table 1. Structures of AAS.



AAS	C1-2	C3	C4-5	C5-6	C7	C17	C19
Dehydroepiandrosterone (DHEA)		-OH	-	=			
Nortestosterone (NT)							-H
Boldenone (B)	=						
Testosterone (T)						β	
Norethindrone (NE)						-C \equiv CH	-H
Metandrostenedione (DMT)	=					-CH ₃	
Methyltestosterone (MT)						-CH ₃	
Bolasterone (BLS)					-CH ₃	-CH ₃	

Table 2. Retention time (t_r), resolution (R_s), AAS-TMS molecular mass (MM) and selected ion (m/z) of the TMS derivatives of AAS.

AAS-TMS	t_r (min)	R_s	MM	Selected ions (m/z)
DHEA	14.67	----	432	417, 418, 432, 433
NT	15.16	4.6	418	418, 419, 420, 421
B	15.60	4.6	430	415, 430, 431, 432
T	15.79	2.3	432	417, 431, 432, 433
NE	16.82	11.8	442	427, 428, 442, 444
DMT	16.89	0.9	444	429, 444, 445, 446
MT	17.10	2.5	446	301, 445, 446, 448
BLS	17.17	0.9	460	445, 446, 447, 448

Table 3. Linear regression equations, $y = A + Bx^a$, using spiked piglet feed samples; decision limits ($CC\alpha$), detection capabilities ($CC\beta$) and extraction efficiencies (% E).

AAS-TMS	A	$B \cdot 10^2$	r	$CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	% E \pm CV
DHEA	0.008	2.59	0.999	13	18	85 \pm 9
NT	0.015	3.94	0.997	10	23	98 \pm 8
B	-0.022	0.93	0.998	21	35	98 \pm 7
NE	-0.017	1.44	0.996	13	19	78 \pm 7
DMT	-0.009	0.75	0.998	15	28	99 \pm 9
MT	0.013	1.85	0.999	11	22	78 \pm 3
BLS	0.020	2.24	0.994	15	20	80 \pm 3

^a x = mg kg⁻¹

Table 4. Precision and accuracy using sample preparation at different concentration levels of AAS^a.

AAS	Repeatability						Within-laboratory reproducibility						Accuracy
	CCβ	%CV	1.5CCβ	%CV	2CCβ	%CV	CCβ	%CV	1.5CCβ	%CV	2CCβ	%CV	
DHEA	19	6.8	28	4.9	36	3.5	18	10.2	27	7.3	36	4.1	100 ± 3
NT	25	7.1	37	5.0	45	4.6	23	11.0	35	7.9	46	6.3	99 ± 5
B	36	6.8	45	6.1	71	5.3	35	11.6	50	8.6	71	7.4	99 ± 8
NE	20	7.5	26	4.3	39	4.7	19	10.4	29	8.1	38	6.5	101 ± 4
DMT	28	6.6	41	7.2	58	3.6	28	12.1	42	9.2	56	6.3	103 ± 3
MT	22	8.1	36	6.8	45	5.7	23	9.5	33	8.3	44	7.3	99 ± 8
BLS	21	9.0	29	7.4	40	4.2	19	11.4	29	9.7	41	5.5	99 ± 4

^a CCβ units are µg kg⁻¹.

Table 5. Youden robustness test: variables and their levels in the experimental design and results obtained for piglet feed samples spiked with AAS.

Selected variable	Experiment No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Operator	A	A	A	A	a	a	a	a
Leaching volume	B	B	b	b	B	B	b	b
Saponification-volume	C	c	C	c	C	c	C	c
Saponification-temperature	D	D	d	d	d	d	D	D
LLE volume	E	e	E	e	e	E	e	E
Final extract evaporation temperature	F	f	f	F	F	f	f	F
Derivatization-time	G	g	g	G	g	G	G	g
Observed results	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Selected variable	Units	Abbreviation ^a	High level	Low level
Operator	---	A,a	1	2
Leaching volume	mL	B,b	4.5	3.5
Saponification-volume	mL	C,c	3.5	2.5
Saponification-temperature	°C	D,d	35	25
LLE volume	mL	E,e	4.5	3.5
Final extract evaporation temperature	°C	F,f	45	35
Derivatization-time	min	G,g	25	15

Variable	Differences (%)
Operator	3.5
Leaching volume	2.1
Saponification-volume	4.5
Saponification-temperature	5.7
LLE volume	3.7
Final extract evaporation temperature	2.2
Derivatization-time	2.6

^a Upper and lower case letters represent high and low levels values of the variable, respectively.

^b Cartridge was maintained wet at all stages during the clean up process.

^c The cartridge was left to dry for 1 min after sample application.

Table 6. Composition of feeds under study in % (w/w).

No	Animal	Humidity	Protein	Fat	Fiber	Starch	Calcium	Phosphorus
4	Cow	10.9	16.5	2.6	7.9	33.9	0.97	0.54
6	Calf	11.6	14.6	2.7	7.2	39.6	0.97	0.47
9	Growing pig	10.9	16.4	2.8	4.4	43.4	0.90	0.51
10	Finishing pig	11.0	16.6	3.3	4.3	44.2	0.69	0.50
15	Laying hen	11.0	15.1	3.2	3.4	46.6	2.17	0.40
17	Poultry	11.1	17.0	3.8	3.9	42.7	1.02	0.55
21	Nursing calf	10.1	18.3	4.2	3.3	43.2	0.86	0.58
23	Nursing lamb	10.7	21.5	4.2	3.9	44.1	0.85	0.47

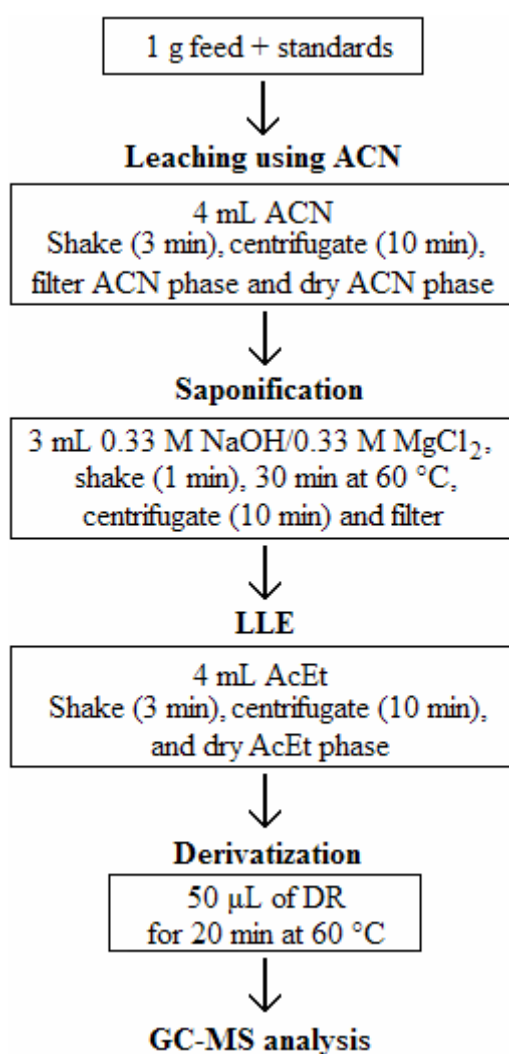


Fig. 1. Scheme of the extraction procedure used for feed samples preparation.

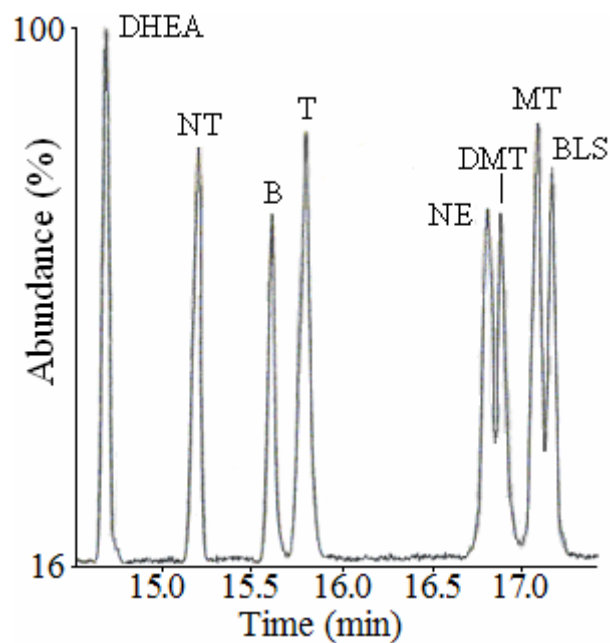


Fig. 2. Chromatogram of the optimum separation and mass spectrum of AAS-TMS under study. AAS concentration was $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

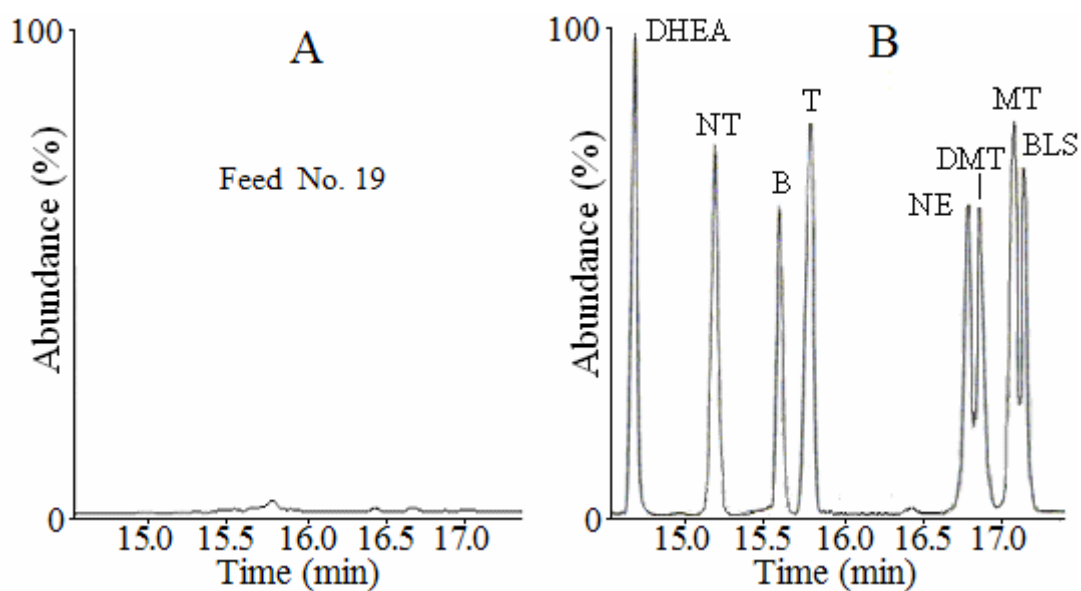


Fig. 3. Chromatograms obtained (A) for a piglet feed blank and (B) and for a piglet feed sample (feed No. 19) spiked with AAS (1.25 mg kg^{-1}) under GC-MS conditions described in 2.2. and 3.1 sections.

References

- [1] Hartmann, S., Steinhart, H., *J. Chromatogr. B* 1997, 704, 105-117.
- [2] Commission EC. Council Directive 96/23/EC. *Off. J. Eur. Communities* 1996, L125, 10.
- [3] Commission EC. Council Directive 2003/74/EC. *Off. J. Eur. Communities*, 2003, L262, 17.
- [4] Real Decreto 2178/2004, Ministerio de la Presidencia, Spain.
- [5] Courtheyn, D., Le Bizec, B., Brambilla, G., De Brabander, H.F., Cobbaert, E., Van de Wiele, M., Vercammen, J., De Wasch, K., *Anal. Chim. Acta* 2002, 473, 71-82.
- [6] Nielen, M.W.F., Rutgers, P., van Bennekom, E.O., Lasaroms, J.J.P., Van Rhijn, J.A., *J. Chromatogr. B* 2004, 801, 273-283.
- [7] Marwah, A., Marwah, P., Lardy, H., *J. Chromatogr. B* 2005, 824, 107-115.
- [8] Van Puymbroeck, M., Leyssens, L., Vanderzande, D., Gelan, J., Raus, J., *Analyst* 1998, 123, 2449-2452.
- [9] Gonzalo-Lumbreras, R., Muñoz-Valencia, R., Santos-Montes, A., Izquierdo-Hornillos, R., *J. Chromatogr. A* 2007, 1156, 321-330.
- [10] Balizs, G., Hewitt, A., *Anal. Chim. Acta* 2003, 492, 105-131.
- [11] Van Poucke, C., Van De Velde, M., Van Peteghem, C., *J. Mass Spectrom.* 2005, 40, 731-738.
- [12] Marcos, J., de la Torre, X., Gonzalez, J.C., Segura, J., Pascual, J.A., *Anal. Chim. Acta* 2004, 522, 79-88.
- [13] Daeseleire, E., Vandeputte, R., Van Peteghem C., *Analyst* 1998, 123, 2595-2598.
- [14] Gaillard, Y., Vayssette, F., Ballant, A., Pépin, G., *J. Chromatogr. B* 1999, 735, 189-205.
- [15] Marcos, V., Perogordo, E., Espinosa, P., Martin de Pozuelo, M., Hooghuis, H., *Anal. Chim. Acta* 2004, 507, 219-227.
- [16] De Wasch, K., Le Bizec, B., De Brabander, H., André, F., Impens, S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001, 15, 1442-1447.
- [17] Hewitt, S.A., Kearney, M., Currie, J.W., Young, P.B., Kennedy, D.G., *Anal. Chim. Acta* 2002, 473, 99-109.
- [18] Stolke, A.A.M., Brinkman, U.A.Th., *J. Chromatogr. A* 2005, 1067, 15-53.
- [19] Schänzer, W., Donike, M., *Anal. Chim. Acta* 1993, 275, 23-48.
- [20] Impens, S., Courtheyn, D., De Wasch, K., De Brabander, H., *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 269-280.
- [21] Commission EC. Council Directive 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Communities* 2002, L221, 8.

CAPÍTULO IV

Conclusiones

Las conclusiones se han agrupado teniendo en cuenta los resultados obtenidos en LC y CG expuestos en los subcapítulos anteriores:

En LC (Subcapítulos III.1-III.5)

En CG (Subcapítulo III.6)

Capítulo III.1. Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de esteroides (corticoides y anabolizantes) en pienso.

- Se optimizó sistemáticamente la composición de la fase móvil (método de Glajch) para la separación de una mezcla de 18 esteroides oralmente activos (corticoides y anabolizantes) utilizando una columna Hypersil ODS a 30°C, flujo de 1 mL/min y detección UV a 245nm (200nm para DHEA). Se obtuvieron diferentes separaciones con los diferentes modificadores estudiados así como con sus mezclas. Se seleccionó como fase óptima acetonitrilo:agua (35:65, v/v) que permitió la separación de 16 esteroides en 30 min.
- La retención de los esteroides se relacionó con su estructura, permitiendo clasificarlos en 3 grupos (G): en el G-I se incluyen los compuestos menos retenidos (corticoides), el G-II presenta retención intermedia (corticoides y anabolizantes) y, por último, el G-III presenta fuerte retención (anabolizantes).
- A fin de mejorar dicha separación se probaron varios tipos de columnas de base sílica bajo las condiciones óptimas: Tipo A (Lichrospher C8) y Tipo B (Luna C18, Kromasil C18, Purospher C18 y Synergy C12). La retención obtenida de estas separaciones se relacionó con los parametros de selectividad de las columnas.
- Teniendo en cuenta resolución, número de esteroides separados y tiempo de análisis, se seleccionó la columna Hypersil ODS como la mejor opción para posteriores experimentos.
- La separación se aplicó al análisis de esteroides añadidos a muestras de pienso para lechones.
- El procedimiento de preparación de muestra consistió en una lixiviación con dietileter y extracción en fase sólida con cartuchos de sílica.
- Finalmente el método propuesto se validó de acuerdo a los criterios establecidos por la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC para métodos criba cuantitativos. Los porcentajes de extracción, límites de decisión y capacidades de detección (CC β) estuvieron en el rango de 70-92%, 34-198 y 41-249 $\mu\text{g/kg}$ y la repetibilidad evaluada como el coeficiente de variación a concentración de 1, 1.5 y 2 CC β fueron menores a 17, 15 y 12%, respectivamente.

Capítulo III.2. Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso usando una columna monolítica.

- Se optimizó la separación de una mezcla de 7 esteroides androgénicos anabolizantes (EAA) usando una columna Chromolith RP-18e, detección UV-DAD a 245nm y epitestosterona como patrón interno. El desarrollo del método incluyó el estudio de fases móviles hidroorgánicas utilizando metanol o acetonitrilo como modificadores orgánicos, flujo y temperatura. La separación óptima se consiguió utilizando acetonitrilo:agua (29:71, v/v), flujo de 3 mL/min y 40 °C, logrando la separación de todos los EAA a línea base en un tiempo de análisis cercano a 15 min.
- La separación óptima se aplicó al análisis de EAA en muestras de pienso para cerdos, previa optimización del tratamiento de muestra.
- El procedimiento de preparación de muestra óptimo incluye una lixiviación con ACN, saponificación y EFS con cartuchos poliméricos Nexus.
- Posteriormente, el método optimizado se validó de acuerdo a los criterios establecidos por la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC para métodos criba cuantitativos, evaluándose selectividad, linealidad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad intra-laboratorio, exactitud y robustez.
- Las eficiencias de extracción, límites de decisión, capacidades de detección (CC β) y exactitud para los EAA estuvieron en el rango de 83-96%, 27-37 μ g/kg, 32-47 μ g/kg y 99-103%. La reproducibilidad intra-laboratorio evaluada como el coeficiente de variación a concentración de 1, 1.5 y 2 CC β fueron menores a 13, 10 y 8%, respectivamente.
- Finalmente, el método propuesto se aplicó a 8 piensos destinados a otros animales. En todos los casos no se encontraron interferencias en los tiempos de análisis de los EAA, con lo cual el método propuesto es adecuado para determinar los EAA en estas muestras.

Capítulo III.3. Desarrollo y validación de un método por HPLC para la determinación de corticoides en pienso usando una columna monolítica.

- Este método incluye la optimización de la separación de una mezcla de 7 corticoides (CC) usando una columna Chromolith RP-18e con detección UV-DAD a 245nm. Se estudian fases móviles hidroorgánicas de metanol o acetonitrilo, flujo y temperatura. La separación óptima se consiguió utilizando acetonitrilo:agua (21:79, v/v), flujo de 3 mL/min y 40 °C, logrando la separación de los 7 CC (4 a línea base) en un tiempo de análisis cercano a 10 min.
- Esta separación se aplicó al análisis de CC en muestras de pienso para pollos utilizando un tratamiento de muestra previamente optimizado para el análisis de esteroides andrógenicos anabolizantes en pienso para cerdos (Cap. III.2).
- Posteriormente, el método se validó de acuerdo a los criterios establecidos por la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC para métodos criba cuantitativos, evaluándose la selectividad, linealidad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad intra-laboratorio, exactitud y robustez.
- Las eficiencias de extracción, límites de decisión, capacidades de detección (CC β) y exactitud para los CC estuvieron en el rango de 86-92%, 27-36 μ g/kg, 33-43 μ g/kg y 98-103%. La reproducibilidad intra-laboratorio evaluada como el coeficiente de variación a concentración de 1, 1.5 y 2 CC β fueron menores a 10, 7 y 5%, respectivamente.
- Por último, análogamente a lo descrito en III.2, el método propuesto se aplicó a 8 tipos de pienso diferentes obteniéndose resultados satisfactorios.

Capítulo III.4. Mejoras en el tratamiento de muestra para el análisis de esteroides (corticoides y anabolizantes) en piensos.

- Al aplicar el tratamiento de muestra desarrollado para pienso de lechones (Cap. III) a una mezcla de 17 esteroides oralmente activos (corticoides y anabolizantes) añadidos a otros piensos, no se obtuvieron los resultados esperados. Para mejorar este procedimiento de preparación de muestra, se empleó la separación descrita en el Cap. III. En estas condiciones se separaron 16 de 17 esteroides en un tiempo de análisis cercano a 30 min.
- El nuevo tratamiento de muestra se basó en otros previamente descritos para muestras de pienso para lechones (Cap. III -corticoides y anabolizantes-), cerdos (Cap. IV -corticoides-) y pollos (Cap. V -anabolizantes-). Éste consistió en un proceso de lixiviación con diferentes disolventes, saponificación y extracción en fase sólida con diferentes tipos de cartuchos (base sílica y poliméricos). Como agente lixivante se eligió el acetonitrilo, la saponificación se realizó con una solución de NaOH pH 10 y la extracción en fase sólida se realiza con cartuchos poliméricos Nexus. La clave de la mejora reside en un lavado preliminar con agua pH 10 y otro con metanol:agua (40:60, v/v) previo a la elución con acetato de etilo.
- El método propuesto se aplicó al análisis de muestras de pienso para lechones añadidas con esteroides.
- El método se valida en pienso para lechones siguiendo pautas similares a las consideradas en los Caps. III. IV y V. Se evaluaron linealidad, selectividad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad intra-laboratorio, exactitud y robustez utilizando el test de Youden.
- Las eficiencias de extracción, límites de decisión, capacidades de detección ($CC\beta$) y exactitud para los esteroides estuvieron en el rango de 78-100%, 19-40 $\mu\text{g/kg}$, 24-53 $\mu\text{g/kg}$ y 97-101%, respectivamente. La reproducibilidad intra-laboratorio evaluada como el coeficiente de variación a concentración de 1, 1.5 y 2 $CC\beta$ fueron menores a 10, 8 y 6%, respectivamente.
- Finalmente, el método propuesto se aplicó al análisis de esteroides en otros tipos de pienso obteniéndose resultados satisfactorios.

Capítulo III.5. Desarrollo y validación de un método por HPLC con elución en gradiente para la determinación de esteroides (corticoides y anabolizantes) en aguas de consumo animal.

- Se optimizó la separación en modo gradiente de una mezcla de 20 esteroides oralmente activos (corticoides y anabolizantes), incluyendo OM y DZ fuertemente retenidos, en aguas de consumo animal procedentes de abrevaderos sitios en áreas próximas a la Sierra de Guadarrama mediante HPLC-UV y diferentes columnas de fase reversa.
- Con el fin de obtener información para la optimización del gradiente, se estudio el efecto de diferentes columnas de fase reversa (Hypersil C18, Gemini C18, Purospher Star C18, Synergi Max C12 y Synergi Fusion) en la separación de los esteroides utilizando la fase móvil isocrática optimizada en el (Cap III.1), detección UV-DAD a 245 nm (280 nm para OM y DZ).
- El orden de elución fue el mismo para todas las columnas: La retención de los esteroides permitió clasificar a estos compuestos en 3 grupos (G): en el G-I se incluyen los compuestos menos retenidos (corticoides), el G-II presenta retención intermedia (corticoides y anabolizantes) y, por último, el G-III presenta fuerte retención (anabolizantes).
- Con la información de las separaciones isocráticas obtenidas con todas las columnas, se diseñó un gradiente-segmentado común que consistió en tres pendientes 0.3, 1.7 y 3.8 % de acetonitrilo/min para eluir a los G-I, II y III, respectivamente. En otras palabras dicho gradiente consistió en un aumento de 32, 35, 45 y 60 en 0, 10, 16 y 20 min, y manteniendo en 60% durante 14 min.
- Posteriormente, se optimizó el gradiente para cada una de las columnas y se evaluaron las características de las separaciones.
- Teniendo en cuenta resolución, número de esteroides separados y tiempo de análisis, se seleccionó la columna Purospher Star C₁₈ como la mejor opción para posteriores experimentos. Las condiciones óptimas de la separación fueron 30 °C, un gradiente acetonitrilo:agua [aumento de 32, 35, 42, 68 y 75% en 0, 10, 14, 18 y 20 min y mantenido en 75% durante 6 min] como fase móvil, detección UV-DAD y flujo de 1 mL/min.
- La separación óptima permitió la separación de 19 de 20 esteroides (18 separados a línea base) en un tiempo de análisis cercano a 26 min con valores de resolución y asimetría en el rango de 0.8-12.6 y 0.9-1.2, respectivamente.
- La separación se aplicó al análisis de esteroides en muestras de aguas de abrevaderos, previa aplicación de un tratamiento de muestra optimizado, en nuestro laboratorio, para el análisis de esteroides en muestras de orina el cual incluye extracción en fase sólida con cartuchos C₁₈

- Posteriormente, el método se validó en un agua de abrevadero siguiendo pautas similares a las consideradas en Caps. anteriores, evaluándose la selectividad, linealidad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad intra-laboratorio, exactitud y robustez utilizando el test de Youden.
- Las eficiencias de extracción, límites de decisión, capacidades de detección (CC β) y exactitud para los CC estuvieron en el rango de 93-101%, 7-10 $\mu\text{g/L}$, 8-15 $\mu\text{g/L}$ y 99-100%. La reproducibilidad intra-laboratorio evaluada como el coeficiente de variación a concentración de 1, 1.5 y 2 CC β fueron menores a 7, 5 y 4.4%, respectivamente.
- Por último, el método propuesto se aplicó a otras aguas con resultados satisfactorios.

Capítulo III.6. Desarrollo y validación de un método por GC-MS para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso.

- Se optimizó la separación de una mezcla de los trimetilsilis derivados de 7 esteroides androgénicos anabolizantes (EAA), estudiando diferentes gradientes de temperatura, con una columna capilar Zebron ZB-5, flujo de 1.5 mL/min, testosterona como patrón interno y detección MS. Los trimetilsilil derivados de los EAA se obtuvieron con N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida. La identificación se realizó mediante un barrido de 50-450 masa/carga y la cuantificación en modo de selección de iones.
- Tras ensayar varios gradientes de temperatura, la separación óptima se consiguió utilizando dos pendientes (10 y 7 °C/min) logrando la separación de los EAA en un tiempo de análisis cercano a 18 min con valores de resolución en el rango de 1-12. Esta separación se aplicó posteriormente al análisis de EAA en muestras de pienso para lechones, previa optimización del tratamiento de muestra.
- Se optimizó el proceso de preparación de muestras estudiando el efecto de diferentes disolventes para lixiviar (DCM, AcEt, DEE y ACN), de distintos procesos para eliminar interferencias y extracción ELL. El tratamiento de muestra óptimo incluye una lixiviación con acetonitrilo, saponificación mediante una disolución binaria NaOH:MgCl₂ y extracción líquido-líquido con acetato de etilo.
- La validación del método se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC para métodos cuantitativos de confirmación, evaluándose la selectividad, linealidad, eficiencia de extracción, límite de decisión, capacidad de detección, repetibilidad, reproducibilidad intra-laboratorio, exactitud y robustez utilizando el test de Youden.
- Las eficiencias de extracción, límites de decisión, capacidades de detección (CC β) y exactitud para los CC estuvieron en el rango de 78-98%, 10-21 µg/kg, 18-35 µg/kg y 99-103%. La reproducibilidad intra-laboratorio evaluada como el coeficiente de variación a concentración de 1, 1.5 y 2 CC β fueron menores a 13, 10 y 8%, respectivamente.
- Finalmente y de forma analoga a lo descrito en cromatografía líquida, el método propuesto se aplicó a otros 8 tipos diferentes piensos; no encontrándose interferencias a los tiempos de análisis de los esteroides. Con lo cual el método propuesto es adecuado para determinar los EAA en las muestras de piensos estudiadas.

CAPÍTULO V

Discusión integradora

V.1. Logros Alcanzados

Como se ha mencionado al inicio de la memoria, el objetivo del trabajo es el desarrollo y validación de métodos cromatográficos para el análisis de mezclas complejas de esteroides (corticoides y anabolizantes) en muestras de piensos y aguas de consumo animal para controlar su administración ilegal. Consecuentemente para cumplir los objetivos, se han desarrollado (optimizando las separaciones cromatográficas y los tratamientos de muestras) y validado, de acuerdo a la normativa europea, los siguientes métodos:

- Por HPLC para la determinación de 18 esteroides (corticoides y anabolizantes) en pienso para lechones.
- Por HPLC para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso para cerdos usando una columna monolítica.
- Por HPLC para la determinación de corticoides en pienso para pollos usando una columna monolítica.
- Por HPLC, mejoras en el tratamiento de muestra para el análisis de esteroides en piensos.
- Por HPLC con elución en gradiente para la determinación de 20 esteroides (corticoides y anabolizantes) en aguas de consumo animal de la Sierra de Guadarrama.
- Por GC-MS para la determinación de esteroides anabolizantes en pienso para lechones.

V.2. Futuras investigaciones

En HPLC, existen diferentes posibilidades de mejorar las separaciones conseguidas mediante columnas de nueva generación, e.g. columnas de fase reversa con tamaño de partícula, diámetro y longitud menores que las convencionales.

En GC-MS, a pesar de los avances logrados, los procedimientos de preparación de muestra para esteroides en piensos son susceptibles de mejora. El problema que representa la derivatización de los esteroides es que el extracto final presenta muchas interferencias debido a que también se derivatizan todos los compuestos de la matriz que tengan grupos hidroxilo y carbonilo. Así pues, si se quiere mejorar el tratamiento de muestra se tendrá que estudiar a fondo la extracción en fase sólida y líquido-líquido, saponificación, reacción de derivatización, etc. (e.g. aplicar una saponificación más intensa, probar cartuchos poliméricos de extracción en fase sólida a pH básico, distintos métodos de derivatización, etc).

En general, también se podrían desarrollar métodos para cócteles que contengan esteroides con otro tipo de drogas prohibidas en la Unión Europea e.g. estimulantes, diuréticos.

CAPÍTULO VI

Bibliografía

-
- (1) S.C. Anderson, S. Cockayne, **“Química clínica”**. Interamericana. México D.F., Mexico, (1970).
 - (2) L.A. Kaplan, A.J. Pesce, **“Química clínica”**. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, (1989).
 - (3) G.I. Wadler, B. Hainline, **“Drugs and Athlete”**. F.A. Davis. Philadelphia, USA, (1989).
 - (4) D. L. Kasper, E. Braunwald, A. S. Fauci, S. L. Hauser, D. L. Longo, J. L. Jameson, K. J. Isselbacher, **“Principios de medicina interna”**, 16ª edición, McGraw-Hill Interamericana, México, (2006).
 - (5) J.M. Hoberman, C.E. Yesalis, **Investigación y Ciencia.**, 4 (1995) 58.
 - (6) R. N. Ondarza, **“Biología Moderna”**, 8ª edición, Editorial Trillas, México, 1993.
 - (7) W. Schänzer, M. Donike, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 23.
 - (8) C. Rodríguez Bueno, **“Estudio de los elementos de análisis utilizados y propuestos como detectores de la testosterona en el control analítico del dopaje”**, Tesis Doctoral, U.C.M. Madrid, España, (1993).
 - (9) S.E. Lucas, **TIPS 14**, (1993) 61.
 - (10) Real Decreto 2269-8/2006, Ministerio de la Presidencia, Madrid, España
 - (11) V.L. Serrano, **“Agentes anabólicos”**, Boletín científico, División Veterinaria 2 (1985) 1.
 - (12) W. Haresing, D. J. A. Cole, **“Avances en nutrición de rumiantes”**, Acirbia, Madrid España, (1988).
 - (13) I. Jaramillo, **“Anabólicos y hormonas en ceba de novillos”**, Tesis Doctoral, Universidad de Caldas, Colombia (1974).
 - (14) C.A. Ricks, R.H. Dalrymple, P.K. Baker, D.L. Iingle, **J. Anim. Sci.**, 59 (1984) 1247.
 - (15) G. Isaza, J. Gonzalez, **“Efecto del Zeranol y el estradiol 17β sobre el peso al destete en terneros cruzados”**, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira (1985).
 - (16) R. Clayton, **Anal. Chim. Acta**, 529 (2005) 3.
 - (17) Commission Decision 93/256/EC of 14 April 1993, Off. **J. Eur. Commun.**, L118 (1993).
 - (18) Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, Off. **J. Eur. Commun.**, L221 (2002).
 - (19) Real Decreto 2178/2004 de 12 de noviembre, Ministerio de la Presidencia, Madrid, España, 274 (2004) 37490.
 - (20) Commission of EU, Council Directive 96/22/EC, Off. **J. Eur. Commun.**, L125 (1996).
 - (21) Draft Commission Decision SANCO/1085/2000.
 - (22) J. Sabbe, T. Vander Beken, **“The illegal use of growth promoters in Europe”**, Comparative report, BUFALAW-2001, Belgium, 15-16 November 2001.
 - (23) Commission of EU. Council Directive 2003/74/EC. Off. **J. Eur. Commun.**, L 262 (2003) 17.
 - (24) P. Marchand, B. Le Bizec, C. Gade, F. Monteau F. André, **J. Chromatogr. B**, 867 (2000) 219.
 - (25) S. Hewitt, M. Kearney, J. Currie, P. Young D. Kennedy, **Anal. Chim. Acta**, 473 (2002) 99.
 - (26) S. Impens, D. Courtheyn, K. De Wasch, H. De Brabander, **Anal. Chim. Acta**, 483 (2003) 269.
 - (27) F. Kearns, H. McKeever, K. Malinowsky, B. Struck, T. Abe, **J. Appl. Physiol.**, 91 (2001) 2064.
 - (28) G. Guyer, M.A. Miller, **“Low Fat Meal: Desing Strategies and Human Implications”**, NY, Acad. Press (1995) 53.

-
- (29) D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla, H. De Brabander, E. Cobbaert, M. Van de Wiele, J. Vercammen K. De Wasch, **Anal. Chim. Acta**, 473 (2002) 71.
- (30) V. Sporano, L. Grasso, M. Esposito, G. Oliveiro, G. Brambilla, A. Loizo, **Vet. Human. Toxicol.**, 40 (1998) 141.
- (31) J. Martínez-Navarro, **Lancet**, 36 (1990) 1311.
- (32) J. Groot, R. Schilt, J.S. Ossenkoppele, P. Berende, W. Haasnoot, **J. Vet. Med. A**, 45 (1998) 425.
- (33) G. Brambilla, S. De Filippis, **Anal. Chim. Acta**, 529 (2005) 7.
- (34) G. Abraham, J. Gottschalk, F.R. Ungemach, **J. Pharmacol.**, 72 (2004) 196.
- (35) E.D. Harris (Jr.), R.D. Emkey, J.E. Nichols, **J. Rheumatol.**, 10 (1983) 713.
- (36) A.C. Verhoeven, M. Boers, **J. Rheumatol.**, 24 (1997) 1495.
- (37) J.D. Adachi, A. Rostom, **Inflamm Bowel Dis.**, 5(1999) 200.
- (38) P.S. Hench, E.C. Kendall, C.H. Slocumb, H.F. Polley, **Mayo Clinic Proc.**, 24 (1949) 181.
- (39) P.S. Hench, E.C. Kendall, C.H. Slocumb, H.F. Polley, **“VII International Congress on Rheumatic Diseases”**, Edited by Committee on Publications, American Rheumatism Association, Philadelphia, USA (1952) 131.
- (40) P.S. Hench, **Minn. Med.**, 36 (1953) 705.
- (41) P.S. Hench, E.C. Kendall, C.H. Slocumb, H.F. Polley, **Arch. Int. Med.**, 85 (1950) 545.
- (42) P.S. Hench, In “Les Prix Nobel en 1950”. Stockholm, **PA Norstedt Soner**, (1951) 195.
- (43) H.F. Polley, C.H. Slocumb, **Mayo Clinic Proc.**, 51 (1976) 471.
- (44) H.F. Polley, **Mayo Clinic Proc.**, 45 (1970) 1.
- (45) H.F. Polley, **Landmark advances in Rheumatol.**, (1985) 9.
- (46) P.S. Hench, **Ann. Int. Med.**, 36 (1952) 1.
- (47) C.J. Smyth, R.H. Freyberg, C. McEwen, **“History of Rheumatology in the United States.”** Arthritis Foundation, Georgia, USA (1985).
- (48) L.J. Soffer, M.F. Levitt, G. Baehr, **Arch. Int. Med.**, 86 (1950) 558.
- (49) L.J. Soffer, S.K. Elster, D.J. Hamerman, **Arch. Int. Med.**, 93 (1954) 503.
- (50) E. Herrera, **“Bioquímica”**. Interamericana Mc Graw-Hill, Madrid, (1991).
- (51) K. Jungermann, H. Möhler, **“Bioquímica”**. Pirámides, Madrid, (1984).
- (52) A.S. Fauci, D.C. Dale, J.E. Balow, **Ann. Int. Med.**, 84 (1976) 304.
- (53) C.G. Craddock, **Ann. Int. Med.**, 88 (1978) 564.
- (54) R. Garrido, L. Cabrera, **“Toxicología, toxicomanías”**, Colegio Oficial de Farmacéuticos, Madrid (1985).
- (55) Y. Gaillard, F. Vayssette, G. Pepin, **Forens. Sci. Int.**, 107 (2000) 361.
- (56) Ph. Gaignage, G. Lognay, D. Bosson, D. Vertongen, Ph. Dreze, M. Marlier, M. Severin, **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.**, 16 (1991) 219.
- (57) K. Vanoosthuyze, L. Van Poucke, A. Deloof, C. Van Peteghem, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 177.

-
- (58) D. Courtheyn, J. Veracammen, H.F. De-Brabender, I. Vandenreyt, P. Batjoens, K. Vanoosthuyze, C. Van Peteghem, **Analyst**, 119 (1994) 2557.
- (59) R. Bagnati, V. Ramazza, M. Zucchi, A. Simonella, F. Leone, A. Bellini, R. Fanelli, **Anal. Biochem.**, 235 (1996) 119.
- (60) S. Rizea-Savu, L. Silvestro, A. Haag, F. Sörgel, **J. Mass Spectrom.**, 31 (1996) 1351.
- (61) H.H. Meyer, I. Duersch, **Arch. Lebensmittelhyg.**, 47 (1996) 22.
- (62) K. De-Wasch, H. De-Brabender, D. Courtheyn, C. Van Peteghem, **Analyst**, 123 (1998) 2415.
- (63) Y. Iglesias, C.A. Fente, B. Vázquez, C. Franco, A. Cepeda, **J. Agric. Food Chem.**, 47 (1999) 4275.
- (64) O. Huetos, R. Ramos, M.M. De-Pozuelo, M.S. Andres, T.B. Reuvers, **Analyst**, 124 (1999) 1583.
- (65) S. Calvarese, P. Rubini, G. Urbani, N. Ferri, **Analyst**, 119 (1994) 2611.
- (66) L. Cerni, G. Biancotto, A. Tondolo, P. Bogoni, **Food Agric. Immunol.**, 10 (1998) 307.
- (67) M. Fiori, E. Pierdominici, F. Longo, G. Brambilla, **J. Chromatogr. A**, 807 (1998) 219.
- (68) P. Delahaut, P. Jacquemin, Y. Colemonts, M. Dubois, J. De-Grave, H. Deluyker, **J. Chromatogr. B**, 696 (1997) 203.
- (69) S. Ahmed, M. Riaz, **Chromatographia**, 31 (1991) 67.
- (70) C.J. Roberts, L.S. Jackson, **J. Immunol. Methods**, 181 (1995) 157.
- (71) C.S. Creaser, S.J. Feely, E. Houghton, M. Seymour, P. Teale, **Anal. Commun.**, 33 (1996) 5.
- (72) S.S. Hassan, F.J. Rowell, L.S. Jackson, **Anal. Commun.**, 33 (1996) 299.
- (73) M.R. Taylor, P. Teale, S.A. Westwood, **Anal. Chem.**, 69 (1997) 2554.
- (74) L.M. Ribeiro-Neto, H.S. Spinosa, M.C. Salvadori, **J. Anal. Toxicol.**, 21 (1997) 393.
- (75) C.S. Creaser, S.J. Feely, E. Houghton, M. Seymour, **J. Chromatogr. A**, 794 (1998) 37.
- (76) E. Grippa, L. Santini, G. Castellano, M.T. Gatto, M.G. Leone, L. Saso, **J. Chromatogr. B**, 738 (2000) 17.
- (77) C. de Blas, G.G. Mateos, P.G. Rebollar, “**Normas FEDNA para la formulación de piensos compuestos.**” FEDNA, Madrid, (1999).
- (78) C.H. Byant, A. Adam, D.R. Taylor, R.C. Rowe, **Anal. Chim. Acta**, 297 (1994) 317.
- (79) L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.L. Kirkland, “**Practical HPLC method development**” Wiley and sons. Inc., NY (1997).
- (80) P.J. Schoenmakers, A.C.J.H. Drouen, H.A.H. Billiet, L. De Galan, **Chromatographia**, 16 (1982) 688.
- (81) A.C.J.H. Drouen, H.A.H. Billiet, P.J. Schoenmakers Billiet, L. De Galan, **Chromatographia**, 16 (1982) 48.
- (82) B. Bourguignon, F. Marcenac, H.R. Keller, P. F. De Aguiar, D.L. Massart, **J. Chromatogr.**, 628 (1993) 171.
- (83) B. Bourguignon, P. F. De Aguiar, M.S. Khots, D.L. Massart, **Anal. Chem.**, 66 (1994) 893.
- (84) G. Mazerolles, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, A.M. Siouffi, **J. Chromatogr.**, 485 (1989) 433.
- (85) P.F. de Aguiar, J. Van der Heyden, B.L. Massart, **Anal. Chim Acta**, 348 (1997) 223.
- (86) J.L. Glajch, J.K. Kirkland, M.N. Squire, J.M. Minor, **J. Chromatogr.**, 199 (1980) 57.
- (87) N. Tanaka, H. Kobayashi, Kazuki, Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, **Anal. Chem. A-pages**, 73 (2001) 15.

-
- (88) L.R. Snyder, J.W. Dolan, P.W. Carr, **J. Chromatogr. A**, 1060 (2004) 77.
- (89) J.J. Gilroy, J.W. Dolan, P.W. Carr, L.R. Snyder, **J. Chromatogr. A**, 1026 (2004) 77.
- (90) J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, **J. Chromatogr. A**, 1000 (2003) 757.
- (91) N.S. Wilson, M. D. Nelson, J. W. Dolan, L. R. Snyder, G.R. Wolcott, P.W. Carr, **J. Chromatogr. A**, 961 (2002) 171.
- (92) T Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, **Anal. Chem.**, 78 (2006) 7632.
- (93) N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami **J. Chromatogr. A**, 965 (2002) 35.
- (94) F. Gritti, W. Piatkowski, G. Guiochon, **J. Chromatogr. A**, 983 (2003) 51.
- (95) M. Kele, G. Guiochon, **J. Chromatogr. A**, 960 (2002) 19.
- (96) N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, **J. Chromatogr. A**, 960 (2002) 85.
- (97) B. Bidlingmaier, K.K. Unger, N. von Doehren, **J. Chromatogr. A**, 832 (1999) 11.
- (98) V.f. Samanidou, A. S. Ioannou, I. N. Papadoyannis, **J. Chromatogr. B**, 809 (2004) 175.
- (99) L.A. Cole, J.G. Dorsey, **Anal. Chem.**, 64 (1992) 1317.
- (100) P. Jandera, **J. Chromatogr. A**, 1126 (2006) 195.
- (101) M.J. Ruiz-Angel, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, **J. Chromatogr. A**, 1022 (2004) 51.
- (102) M.C. García-Álvarez-Coque, J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, **Anal. Chim. Acta**, 579 (2006) 125.
- (103) G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, **J. Chromatogr. A**, 1018 (2003) 183.
- (104) J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, **J. Chromatogr. A**, 1120 (2006) 308.
- (105) V. Concha-Herrera, G. Vivó-Truyols, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Álvarez-Coque, **J. Chromatogr. A**, 1120 (2006) 79.
- (106) M. Valcárcel, A. Gómez, **“Técnicas analíticas de separación”**, Reverte, España (1988).
- (107) R. Anderson, **“Sample preparation and separation”**, Wiley, Chichester (1997).
- (108) Valcárcel M. y Silva M., **“Teoría y práctica de la extracción líquido-líquido”**, Alhambra. Madrid, España, (1984).
- (109) P.J. Volin **J. Chromatogr. B.**, 671 (1995) 319.
- (110) R.Q. Brewster **“Prácticas de química orgánica”**, Alhambra, Madrid, (1970).
- (111) R.E. Majors **LC-GC.**, 4 (1995) 671.
- (112) **“Tratamiento de muestra mediante extracción en fase sólida”**, Anal. Chem. Intl., Cat (I-III). H.C., USA, (1989-90).
- (113) R.D. McDowall, J.C. Pearce, G.S. Murkitt **J. Pharmaceut. Biomed.**, 4 (1986) 3.
- (114) M.C. Hennion, V. Pichon, Environ. Sci. Technol. 28 (1994) 576A.
- (115) Reactivos Scharlau, S.A., **“Handbook of Extracción en fase sólida”**, Varian, España (1999).
- (116) D. R. Knap, **“Handbook of analytical derivatization reactions”**, John Wiley & Sons, USA, (1979).

-
- (117) S. Görög, “**Cuantitative aspects of the determination of steroid profiles from urine by capillary gas chromatography**” Tesis Doctoral, Eindoven, (1979).
- (118) E. Houghton, P. Teale, M. C. Dumasia, J. K. Wellby, **Biomed. mass spectrom.**, 459 (1982) 9.
- (119) G. Opferman, W. Schänzer, “**Trimethylsilylation-aspects for derivatisation: recent advances in doping analysis**”, Proc 14th Cologne Workshop on Dope Analysis, Cologne, Germany, 1996.
- (120) M. Donike, J. Zimmermann, **J. Chromatogr.**, 483 (1980) 202.
- (121) E. Houghton, P. Teale, M. C. Dumasia, J. K. Wellby, **Biomed. mass spectrometry**, 380 (1982) 30.
- (122) M. Donike, “**Derivatization**” Proc. 4th Cologne Workshop in Dope Analysis, Germany 1986.
- (123) L. Huber. **LC-GC.**, 11 (1998) 96.
- (124) M. Castro, S. Gascón, M. Pujol, J.M. Sans, Ll. Vicente, “**Validación de métodos analíticos**”, A.E.F.I., Sección Catalana, España, (1987).
- (125) E.H.J.M. Jansen, R. Both-Miedema, H. Van Blitterswijk, R.W. Stephany, **J. Chromatogr.**, 299 (1984) 450.
- (126) E.H.J.M. Jansen, P. Zoontjes, H. Van Blitterswijk, R. Both-Miedema, R.W. Stephany, **J. Chromatogr.**, 319 (1985) 436.
- (127) E.H.J.M. Jansen, H. Van Blitterswijk, P. Zoontjes, R. Both-Miedema, R.W. Stephany, **J. Chromatogr.**, 347 (1985) 375.
- (128) E.H.J.M. Jansen, R.H. Van Den Berg, G. Zomer, R. Both-Miedema, C. Enkelaar-Willemsen, R.W. Stephany, **Anal. Chim. Acta**, 170 (1985) 21.
- (129) V. Y. Davydov, G.N. Filatova, E. Smolkova-Keulemansova, Y. Zima, **Chromatographia**, 25 (1988) 1059.
- (130) S. Görög, A. Laukó, B. Herényi, A. Georgakis, E. Csizér, G. Balogh, G. Gálik, S. Mahó, Z. Tuba, **Chromatographia**, 26 (1988) 316.
- (131) L.A. Van Ginkel, R.W. Stephany, H.J. Van Rossum, H. Van Blitterswijk, P.W. Zoontjes, R.C.M. Hooijschuur, J. Zuydendorp, **J. Chromatogr. B**, 489 (1989) 95.
- (132) J.O. De Beer, **J. Chromatogr. B**, 489 (1989) 139.
- (133) W. Haasnoot, R. Schilt, A.R.M. Hamers, F.A. Huf, A. Farjam, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman, **J. Chromatogr. B**, 489 (1989) 157.
- (134) E.H.J.M. Jansen, R. Both-Miedema, **J. Chromatogr. B**, 489 (1989) 57.
- (135) M. Rapp, H.H.D. Meyer, **J. Chromatogr. B**, 489 (1989) 181.
- (136) H.H.D. Meyer, F.X. Hartmann, M. Rapp, **J. Chromatogr. B**, 489 (1989) 173.
- (137) W. Schänzer, G. Oppermann, M. Donike, **J. Steroid. Biochem.**, 36 (1990) 153.
- (138) M.J. Walters, R.J. Ayers, D.J. Brown, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73 (1990) 904.
- (139) J.P. Cravedi, G. Delous, **J. Chromatogr. B**, 564 (1991) 461.
- (140) B. Sprager, M. Metzler, **J. Chromatogr. B**, 564 (1991) 485.
- (141) L.A. Castagnetta, O.M. Granata, M. Lo Castro, M. Calabro, F. Arcuri, G. Carruba, **J. Chromatogr. B**, 572 (1991) 25.
- (142) A. Laganà, A. Marino, **J. Chromatogr.**, 588 (1991) 89.

-
- (143) A. Fargam, J.J. Vreuls, W.J.G.M. Cuppen, U.A.Th. Brinkman, G.J. de Jong, **Anal. Chem.**, 63 (1991) 2481.
- (144) E. Venturelli, A. Manzari, A. Cavalleri, M. Benzo. G. Secreto, E. Marubini, **J. Chromatogr.**, 582 (1992) 7.
- (145) F. Oesch, H. Wagner, K.L. Platt, M. Arand, **J. Chromatogr. B**, 582 (1992) 232.
- (146) G.J. Southan, R.V. Brooks, D.A. Cowan, A.T. Kicman, N. Unnadkat, C.J. Walker, **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, 42 (1992) 87.
- (147) R. Wintersteiger, M.J. Sepúlveda, **Anal. Chim. Acta**, 273 (1993) 383.
- (148) J.P. Cravedi, G. Delous, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 89.
- (149) E. Daeseleire, A. De Guesquière, C. Van Peteghem, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 95.
- (150) G.C. Gatti, G. Zoboli, M. Zucchi, V. Ramazza, C. Cantoni, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 105.
- (151) F. Smets, Ch. Vanhoenackere, G. Pottie, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 147.
- (152) G.W. Stubbings, M.J. Shepherd, **J. Liquid Chromatogr.**, 16 (1993) 241.
- (153) S.A. Hewitt, W.J. Blanchflower, W.J. McCaughey, C.T. Elliott, D.G. Kennedy, **J. Chromatogr.**, 639 (1993) 185.
- (154) A. Santos-Montes, A.I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 620 (1993) 15.
- (155) A. Santos-Montes, R. Gonzalo-Lumbreras, A.I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 652 (1993) 83.
- (156) D. Hooijerink, R. Schilt, E. Van Bennekom, B. Brouwer, **Analyst**, 119 (1994) 2617.
- (157) A. Santos-Montes, R. Gonzalo-Lumbreras, A. I. Gasco-Lopez, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 657 (1994) 248.
- (158) J.L. Dwyer, A.E. Chapman, X. Liu, **LC-GC**, 8 (1995) 704.
- (159) P. Sanwald, E.A. Blankson, B.D. Duléry, J. Schoun, N.D. Huebert, J. Dow, **J. Chromatogr. B**, 672 (1995) 207.
- (160) F. Komatsu, M. Morioka, Y. Fujita, K. Sugahara, H. Kodama, **J. Mass Spectrom.**, 30 (1995) 698.
- (161) P.J. Volin, **J. Chromatogr. B**, 658 (1995) 347.
- (162) S. Torres-Cartas, M.C. García-Alvarez-Coque, R.M. Villanueva-Camañas, **Anal. Chim. Acta**, 302 (1995) 163.
- (163) A. Santos-Montes, R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 673 (1995) 27.
- (164) S. Torres-Cartas, R.M. Villanueva-Camañas, M.C. García-Alvarez-Coque, **Anal. Chim. Acta**, 333 (1996) 31.
- (165) M. Kummer, H.J. Palme, G. Werner, **J. Chromatogr. A**, 749 (1996) 61.
- (166) E.S. Nascimento, M.C. Salvadori, L.M. Ribeiro-Nieto, **J. Chromatogr. Sci.**, 34 (1996) 330.
- (167) M. Fenske, **J. Chromatogr. B**, 670 (1996) 373.
- (168) D. Barrón, J. Barbosa, J.A. Pascual, J. Segura, **J. Mass Spectr.**, 31 (1996) 309.
- (169) V.R. Walker, G.W. Dombi, J.P. Gutai, D.D. Wade, K.H. Swartz, H. Liu, R.R. Schroeder, **Anal. Biochem.**, 234 (1996) 194.
- (170) B.C. Mc Whinney, G. Ward, P.E. Hickman, **Clin. Chem.**, 42 (1996) 979.

-
- (171) M. Salo, H. Sirén, P. Volin, S. Wiedmer, H. Vuorela, **J. Chromatogr. A**, 728 (1996) 83.
- (172) S. Rizea-Savu, L. Silvestro, A. Haag, F. Sörgel, **J. Mass Spectrom.**, 31 (1996) 1351.
- (173) L.D. Bowers, R. Sanaullah, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 61.
- (174) H. Shibasake, T. Furuta, Y. Kasuya, **J. Chromatogr. B**, 692 (1997) 7.
- (175) S.M.R. Stanley, S. Kent, J.P. Rodgers, **J. Chromatogr. B**, 704 (1997) 119.
- (176) K.A. Bean, J.D. Henion, **J. Chromatogr. B**, 690 (1997) 65.
- (177) A. Santos-Montes, E. García-Moreno, R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. Sci.**, 35 (1997) 439.
- (178) M. Hay, P. Mormède, **J. Chromatogr. B**, 702 (1997) 33.
- (179) D.A. Volmer, J.P. Hui, **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 11 (1997) 1926.
- (180) A. Tjernberg, P.O. Edlund, B. Noren, **J. Chromatogr. B**, 715 (1998) 395.
- (181) M. Fiori, E. Pierdominici, F. Longo, G. Brambilla, **J. Chromatogr. A**, 807 (1998) 219.
- (182) M.A. Popot, P. García, F. Fournier, Y. Bonnaire, J.C. Tabet, **Analyst**, 123 (1998) 2649.
- (183) M.J. Sauer, T.P.W. Samuels, L.G. Howells, M.A. Seymour, A. Nedderman, E. Houghton, S.J. Bellworthy, S. Anderson, N.G. Coldham, **Analyst**, 123 (1998) 2653.
- (184) E. Neufeld, R. Chayen, R. Stern, **J. Chromatogr. B**, 718 (1998) 273.
- (185) Y.R. Ku, K.C. Wen, L.K. Ho, Y.S. Chang, **Yaowu Shipin Fenxi**, 7 (1999) 123.
- (186) O. Huetos, M. Ramos, M. Martin de Pozuelo, M. San Andres, T.B.A. Reuvers, **Analyst**, 124 (1999) 1583.
- (187) A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 724 (1999) 53.
- (188) V. Cirimele, P. Kintz, V. Dumestre, J.P. Goulle, B. Ludes, **Forens. Sci. Intl.**, 107 (2000) 381.
- (189) C. Olivera, B. Jasmina, V. Zorica, R. Dusanka, V. Sote, **Il Farmaco**, 55 (2000) 125.
- (190) A.A.M. Stolker, P.L.W.J. Schwillens, L.A. Van Ginkel, U.A.Th. Brinkman, **J. Chromatogr. A**, 893 (2000) 55.
- (191) R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, L. Lucentini, P. Cammarata, **J. Chromatogr. A**, 870 (2000) 511.
- (192) A.H. Que, A. Palm, A.G. Baker, M.V. Novotny, **J. Chromatogr. A**, 887 (2000) 379.
- (193) F. Bévalot, Y. Gaillard, M.A. Lhermitte, G. Pépin, **J. Chromatogr. B**, 740 (2000) 227.
- (194) R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 742 (2000) 1.
- (195) R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 742 (2000) 47.
- (196) Z. Wu, C. Zhang, C. Yang, X. Zhang, E. Wu, **Analyst**, 125 (2000) 2201.
- (197) A. Daxenberger, I. Lange, K. Meyer, H. Meyer, **J. AOAC Intl.**, 83 (2000) 809.
- (198) E.A. Gad Kariem, M. A. Abounasif, M. E. Hagaa, H. A. Al.Khamees, **J. Pharm. biomed. Anal.**, 23 (2000) 413.
- (199) G. Bambrilla, M. Fiori, B. Rizzo, V. Crescenzi, G. Masci, **J. Chromatogr. B**, 759 (2001) 27.
- (200) R. Draiscia, C. Marchiafava, L. Palleschi, P. Cammarata, S. Cavalli, **J. Chromatogr. B**, 753 (2001) 217.
- (201) S. Fiekds, C. Ye, D. Zhang, B. Russell Branch, X. Zhang, **J. Chromatogr. A**, 913 (2001) 197.
- (202) J.P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Puolain, F. André, **J. Chromatogr. A**, 757 (2001) 11.

-
- (203) Q. Jia, M. Hong, Z. Pan, S. Orndorff, **J. Chromatogr. B**, 750 (2001) 81.
- (204) R. Gonzalo-Lumbreras, D. Pimentel-Trapero, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 754 (2001) 419.
- (205) J.P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau, F. André, **Steroids**, 67 (2002) 873.
- (206) A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. B**, 767 (2002) 285.
- (207) C.S. Tamvakopoulos, J.M. Neugebauer, M. Donnelly, P.R. Griffin, **J. Chromatogr. B**, 776 (2002) 161.
- (208) A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. A**, 964 (2002) 137.
- (209) O. Van den Hauwe, F. Dumoulin, J.P. Antignac, M.P. Bouche, C. Elliott, C. Van Peteghem, **Anal. Chim. Acta**, 473 (2002) 127.
- (210) M. López de Alda, A. Gil, E. Paz, D. Barceló, **Analyst**, 127 (2002) 1299.
- (211) G. Friedrich, T. Rose, K. Rissler, **J. Chromatogr. B**, 784 (2003) 49.
- (212) F. Buiairelli, G. Cartoni, F. Coccioli, A. De Rossi, B. Neri, **J. Chromatogr. B**, 784 (2003) 1.
- (213) R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, L. Lucentini, F. Quadri, **J. Chromatogr. B**, 789 (2003) 219.
- (214) E. Gadkariem, H. El-Obeid, M. Abounassif, S. Ahmed, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 31 (2003) 746.
- (215) R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 31 (2003) 201.
- (216) R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 32 (2003) 433.
- (217) D. Murnane, G.P. Martin, C. Marriott, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 40 (2003) 1149.
- (218) T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, **J. Chromatogr. B**, 984 (2003) 198.
- (219) B. Starcevic, E. DiStefano, C. Wang, H. Catlin, **J. Chromatogr. B**, 792 (2003) 197.
- (220) B. Hong, K. Yuen, **J. Chromatogr. B**, 793 (2003) 421.
- (221) R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 794 (2003) 215.
- (222) B. Christiaens, P. Dhiap, O. Rbeida, D. Cello, J. Crommen, Ph. Hubert, **J. Chromatogr. B**, 795 (2003) 73.
- (223) R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. B**, 798 (2003) 69.
- (224) M.W.F. Nielen, H. Hoijerink, M.L. Essers, J.J.P. Lasaroms, E.O. Van Bennekom, L. Brouwer, **Anal. Chim. Acta**, 483 (2003) 11.
- (225) V. Ingrand, G. Herry, J. Beausse, M. René de Roubin, **J. Chromatogr. A**, 1020 (2003) 99.
- (226) M.J. O’Keeffe, S. Martin, L. Regan, **Anal. Chim. Acta**, 483 (2003) 341.
- (227) K. Pihlainen, E. Sippola, R. Kostianen, **J. Chromatogr. A**, 994 (2003) 93.
- (228) S. Hassonville, P. Chiap, J. Liégeois, B. Evrard, L. Delattre, J. Crommen, G. Piel, P. Huberto, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 36 (2004) 133.
- (229) D. Peña-García-Brioles, R. Gonzalo-Lumbreras, R. Izquierdo-Hornillos, A. Santos-Montes, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 36 (2004) 65.
- (230) K. Zurbonsen, F. Bressolle, I. Solassol, P. Aragon, S. Culine, F. Pinguet, **J. Chromatogr. B**, 804 (2004) 421.
- (231) S. Tai, M. Welch, **Anal. Chem.**, 76 (2004) 1008.
- (232) Y. Wang, G. Hochhaus, **J. Chromatogr. B**, 805 (2004) 203.
- (233) H. Liu, X. Chen, S. Zhang, L. Qu, Y. Zhao, H. Liu, M. Dong, **J. Chromatogr. B**, 805 (2004) 255.
- (234) F. Pu, A. McKinney, M. Stenhouse, C. Suann, M. McLeod, **J. Chromatogr. B**, 813 (2004) 241.

-
- (235) M.W.F. Nielen, P. Rutgers, E.O. Van Bennekom, J.J.P. Lasaroms, J.A.H. Van Rhijn, **J. Chromatogr. B**, 801 (2004) 273.
- (236) A. Gupta, P.B. Myrdal, **J. Chromatogr. A**, 1033 (2004) 101.
- (237) H. Hooijerink, A. Lommen, P.P.J. Mulder, J.A. Van Rhijn, M.W.F. Nielen, **Anal. Chim. Acta**, 529 (2005) 167.
- (238) O. Van den Hauwe, F. Dumoulin, C. Elliott, C. Van Peteghem, **J. Chromatogr. B**, 817 (2005) 215.
- (239) R. Gatti, E. Cappellin, B. Zecchin, G. Antonelli, P. Spinella, F. Mantero, E.F. De Palo, **J. Chromatogr. B**, 824 (2005) 51.
- (240) G.N.W. Leung, E.W. Chung, E.N.M. Ho, W.H. Kwok, D.K.K. Leung, F.P.W. Tang, T.S.M. Wan, N.H. Yu, **J. Chromatogr. B**, 825 (2005) 47.
- (241) T. Higashi, A. Yamauchi, K. Shimada, **J. Chromatogr. B**, 825 (2005) 214.
- (242) W. Li, Y. Li, A. Li, S. Zhou, W. Naidong, **J. Chromatogr. B**, 825 (2005) 223.
- (243) K. Deventer, P. Van Eenoo, P. Mikulcikova, W. Van Thuyne, F.T. Delbeke, **J. Chromatogr. B**, 828 (2005) 21.
- (244) F. Guan, C.E. Uboh, L.R. Soma, Y. Luo, J. Rudy, T. Tobin, **J. Chromatogr. B**, 829 (2005) 56.
- (245) R. Gatti, E. Cappellin, B. Zecchin, G. Antonelli, P. Spinella, F. Mantero, E.F. De Palo, **J. Chromatogr. B**, 829 (2005) 154.
- (246) M. Liu, L.S. Li, S.L. Da, Y.Q. Feng, **Talanta** **66**, (2005) 479.
- (247) M.W.F. Nielen, J.J.P. Lasaroms, P.P.J. Mulder, J. Van Hende, J.(Hans)A. Van Rhijn, M.J. Groot **J. Chromatogr. B**, 830 (2006) 126.
- (248) S. Bing, Z. Rong, M. Juan, X. Ying, W. Guohua, H. Jianying, T. Xiaoming, **Anal. Chim. Acta**, 548 (2005) 41.
- (249) A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. B**, 824 (2005) 107.
- (250) N.H. Yu, E.N.M. Ho, D.K.K. Leung, T.S.M. Wan, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 37 (2005) 1031.
- (251) R. Gonzalo-Lumbreras, M.A. García-Miguens, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 38 (2005) 757.
- (252) A. Leinonen, K. Vuorensola, L.M. Lepola, T. Kuuranne, T. Kotiaho, R.A. Ketola, R. Kostinen, **Anal. Chim. Acta**, 559 (2006) 166.
- (253) M. Reig, L. Mora, J.L. Navarro, F. Toldrá, **Meat Sci.**, 74 (2006) 676.
- (254) C.L. Xu, X.G. Chu, C.F. Peng, Z.Y. Jin, L.Y. Wang, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 41 (2006) 616.
- (255) C. Almeida, J.M.F. Nogueira, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 41 (2006) 1303.
- (256) A. Gentili, M. Sergi, D. Perret, S. Marchese, R. Curini, S. Lisandrin, **Rapid Commun. Mass Spectrometry**, 20 (2006) 1845.
- (257) Y. Qin, J. Chen, M. Zhang, **Fenxi Huaxue**, 34 (2006) 298.
- (258) B. Le Bizec, F. Courant, I. Gaudin, E. Bichon, B. Destrez, R. Schilt, R. Draisci, F. Monteau, F. André, **Steroids**, 71 (2006) 1078.

-
- (259) T. Higashi, Y. Ninomiya, N. Iwaki, A. Yamauchi, N. Takayama, K. Shimada, **Steroids**, 71 (2006) 609.
- (260) E.N.M. Ho, D.K.K. Leung, T.S.M. Wan, N.H. Yu, **J. Chromatogr. A**, 1 (2006) 1.
- (261) M. Lampinen-Salomonsson, E. Beckman, U. Bondesson, M. Hedeland, **J. Chromatogr. B**, 833 (2006) 245.
- (262) C. Saudan, J.M. Entenza, N. Baume, P. Mangin, M. Saugy, **J. Chromatogr. B**, 844 (2006) 168.
- (263) J. Van Loco, A. Janosi, S. Impens, S. Fraselle, V. Cornet, J.M. Degroodt, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 8.
- (264) A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 13.
- (265) H. Noppe, K. Verheyden, W. Gillis, D. Courtheyn, P. Vanthemsche, H.F. De Brabander, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 22.
- (266) M.W.F. Nielen, J.J.P. Lasaroms, M.L. Essers, M.B. Sanders, H.H. Heskamp, T.F.H. Bovee, J.H. Van Rhijn, M.J. Groot, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 30.
- (267) C. Van Poucke, C. Detavernier, R. Van Cauwenberghe, C. Van Peteghem, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 35.
- (268) M.H. Spyridaki, P. Kiouisi, A. Vonaparti, P. Valavani, V. Zonaras, M. Zahariou, E. Sianos, G. Tsoupras, C. Georgakopoulos, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 242.
- (269) M.E. Touber, M.C. Van Engelen, C. Georgakopoulos, J.A. Van Rhijn, M.W.F. Nielen, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 137.
- (270) Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Song, Y. Wei, **J. Chromatogr. B**, doi:10.1016/j.chroma.2007.03.098
- (271) T. Higashi, A. Nagahama, N. Otomi, K. Shimada, **J. Chromatogr. B**, 848 (2007) 188.
- (272) E. Strahm, C. Saudan, P.E. Sottas, P. Mangin, M. Saugy, **J. Chromatogr. B**, 852 (2007) 491.
- (273) C. Blasco, C. Van Poucke, C. Van Peteghem, **J. Chromatogr. A**, 1154 (2007) 230.
- (274) T.P. Barry, A. Marwah, P. Marwah, **Aquaculture**, xx (2007) xxx.
- (275) R. Gonzalo-Lumbreras, R. Muñiz-Valencia, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Chromatogr. A**, 1156 (2007) 321.
- (276) R. Muñiz-Valencia, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, **J. Sep. Sci.**, DOI:10.1002/jssc.200700322.
- (277) R. Muñiz-Valencia, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, Enviado a: **Anal. Chim. Acta**.
- (278) R. Muñiz-Valencia, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, Aceptado en: **J. Sep. Sci.**.
- (279) E. Houghton, P. Teale, M.C. Dumasia, **Analyst**, 109 (1984) 273.
- (280) E. Houghton, M.C. Dumasia, P. Teale, **Analyst**, 113 (1988) 1179.
- (281) S. Görög, A. Laukó, B. Herényi, A. Georgakis, E. Csizér, G. Balogh, G. Gálik, S. Mahó, Z. Tuba, **Chromatographia**, 26 (1988) 316.
- (282) L.A. Van Ginkel, R.W. Stephany, H.J. Van Rossum, H. Van Blitterswijk, P.W. Zoontjes, R.C.M. Hooijschuur, J. Zuydendorp, **J. Chromatogr. B**, 489 (1989) 95.

-
- (283) B. Chung, H-Y.P. Choo, T. Kim, K. Eom, E. Kwon, J. Suh, J. Yang, J. Park, **J. Anal. Toxicol.**, 14 (1990) 91.
- (284) R. Massé, C. Ayotte, R. Dugal, **J. Chromatogr.**, 489 (1989) 23.
- (285) H-Y. P. Choo, O-S. Kwon, J. Park, **J. Anal. Toxicol.**, 14 (1990) 109.
- (286) C.Y. Gradeen, S.C. Chan, P.S. Przybylski, **J. Anal. Toxicol.**, 14 (1990) 120.
- (287) W. Schänzer, G. Oppermann, M. Donike, **J. Steroid Biochem.**, 36 (1990) 153.
- (288) B. Sprager, M. Metzler, **J. Chromatogr. B**, 564 (1991) 485.
- (289) R. Massé, H. Bi, P. Du, **Anal. Chim. Acta**, 247 (1991) 211.
- (290) A. Fargam, J.J. Vreuls, W.J.G.M. Cuppen, U.A.Th. Brinkman, G.J. de Jong, **Anal. Chem.**, 63 (1991) 2481.
- (291) G.J. Southan, R.V. Brooks, D.A. Cowan, A.T. Kicman, N. Unnadkat, C.J. Walker, **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**, 42 (1992) 87.
- (292) E.A. Daeseleire, A. De Guesquiere, C.H. Van Peteghem, **J. Chromatogr. Sci.**, 30 (1992) 409.
- (293) W. Schänzer, M. Donike, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 23.
- (294) G. Debruyckere, C.H. Van Peteghem, R. De Sagher, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 49.
- (295) J.P. Cravedi, G. Delous, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 89.
- (296) E. Daeseleire, A. De Guesquière, C. Van Peteghem, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 95.
- (297) B. Le Bizec, M.P. Montrade, F. Monteau, F. André, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 123.
- (298) A.P. Rizzo, E. Alitupa, T. Hirvi, S. Berg, J. Hirn, A. Leinonen, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 135.
- (299) L.A. Van Ginkel, R.W. Stephany, A. Spaan, S.S. Sterk, **Anal. Chim. Acta**, 275 (1993) 75.
- (300) L.M. Thienpont, V.I. De Brabandere, D. Stöckl, A.P. De Leenheer, **Anal. Chem.**, 66 (1994) 4116.
- (301) C. Schoene, A.N.R. Nedderman, E. Houghton, **Analyst**, 119 (1994) 2537.
- (302) H.F. De Brabander, J. Van Hende, P. Batjoens, L. Hendriks, J. Raus, F. Smets, G. Pottie, L. Van Ginkel, R.W. Stephany, **Analyst**, 119 (1994) 2581.
- (303) P.J. Van der Merwe, J.W. Pletersse, **Analyst**, 119 (1994) 2651.
- (304) P. Batjoens, H.F. De Brabander, F. Smets, G. Pottie, **Analyst**, 119 (1994) 2607.
- (305) H.W. Petersen, F. Christensen, M. Vad, **Analyst**, 119 (1994) 2627.
- (306) G. Van Vyncht, P. Gaspar, E. DePauw, G. Maghuin-Rogister, **J. Chromatogr. A**, 683 (1994) 67.
- (307) X. de la Torre, J. Segura, A. Poletti, M. Montagna, **J. Mass Spectrom.**, 30 (1995) 1393.
- (308) C. Legrand, B. Dousset, H. Tronel, F. Belleville, P. Nabet, **J. Chromatogr. B**, 663 (1995) 187.
- (309) M.P. Oriundi, R. Angeletti, E. Bastiani, C. Nachtmann, K.E. Vanoosthuyze, C. Van Peteghem, **Analyst**, 120 (1995) 577.
- (310) L.D. Bowers, D.J. Borts, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 69.
- (311) H.F. De Brabander, P. Batjoens, D. Courtheyn, J. Vercammen, K. De Wasch, **J. Chromatogr. A**, 750 (1996) 105.
- (312) F. Pommier, A. Sioufi, J. Godbillon, **J. Chromatogr. A**, 750 (1996) 75.
- (313) C. Ayotte, D. Goudreault, A. Charlebois, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 3.

-
- (314) M. Garle, R. Ocka, E. Palonek, I. Björkhem, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 55.
- (315) L.D. Bowers, D.J. Borts, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 69.
- (316) T. Kim, J.W. Suh, J.C. Ryu, B.C. Chung, J.Park, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 79.
- (317) I. Dehennin, P. Lafarge, Ph. Dailly, D. Bailloux, J.P. Lafarge, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 85.
- (318) W. Schänzer, P. Delahaut, H. Geyer, M. Machnik, S. Horning, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 93.
- (319) T. Karila, V. Kosunen, A. Leinonen, R. Tähtelä, T. Seppälä, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 109.
- (320) B.K. Yap, R. Kazlauskas, K. Elghazi, G.A.R. Johnston, R.P. Weatherby, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 117.
- (321) R. Aguilera, M. Becchi, C. Grenot, H. Casabianca, C.K. Hatton, **J. Chromatogr. B**, 687 (1996) 43.
- (322) A.S. Clouet, B. Le Bizec, M.P. Montrade, F. Monteau, F. André, **Analyst**, 122 (1997) 471.
- (323) S.M.R. Stanley, S. Kent, J.P. Rodgers, **J. Chromatogr. B**, 704 (1997) 119.
- (324) J. Muñoz-Guerra, D. Carreras, C. Soriano, C. Rodríguez, A.F. Rodríguez, **J. Chromatogr. B**, 704 (1997) 129.
- (325) S. Hartmann, H. Steinhart, **J. Chromatogr. B**, 704 (1997) 105.
- (326) A. Tjernberg, P.O. Edlund, B. Noren, **J. Chromatogr. B**, 715 (1998) 395.
- (327) K. Pongrácz, Zs. Juricskay, **Chromatographia**, 48 (1998) 163.
- (328) T.P. Samuels, A. Nedderman, M.A. Seymour, E. Houghton, **Analyst**, 123 (1998) 2401.
- (329) P.M. Mason, S.E. Hall, I. Gilmour, E. Houghton, C. Pillinger, M.A. Seymour, **Analyst**, 123 (1998) 2405.
- (330) M. Van Puymbroeck, L. Leyssens, D. Vanderzande, J. Gelan, J. Raus, **Analyst**, 123 (1998) 2449.
- (331) S. Sterk, F. Van Tricht, B. Le Bizec, L. Van Ginkel, R. Stephany, **Analyst**, 123 (1998) 2563.
- (332) M. Van Puymbroeck, M.E.M. Kuilman, R.F.M. Maas, R.F. Witkamp, L. Leyssens, D. Vanderzande, J. Gelan, J. Raus, **Analyst**, 123 (1998) 2453.
- (333) A.S. Clouet, B. Le Bizec, F. Boerlen, F. Monteau, F. André, **Analyst**, 123 (1998) 2489.
- (334) E. Daeseleire, R. Van de Putte, C. Van Peteghem, **Analyst**, 123 (1998) 2595.
- (335) V. Ferchaud, B. Le Bizec, F. Monteau, F. André, **Analyst**, 123 (1998) 2617.
- (336) T. Hamoir, D. Cortheyn, H. De Brabander, P. Delahaut, L. Leyssens, G. Pottie, **Analyst**, 123 (1998) 2621.
- (337) S. Sterk, H. Herbold, M. Blockland, H. Van Rossum, L. Van Ginkel, R. Stephany, **Analyst**, 123 (1998) 2633.
- (338) D. Hooijerink, R. Schilt, R. Hoogenboom, M. Huveneers-Oorsprong, **Analyst**, 123 (1998) 2637.
- (339) L. Leyssens, M. Van Puymbroeck, J. Raus, **Analyst**, 123 (1998) 2643.
- (340) D. Maume, B. Le Bizec, P. Marchand, M.P. Montrade, F. André, **Analyst**, 123 (1998) 2645.
- (341) C.Scherer, U. Wachter, S.A. Wudy, **Analyst**, 123 (1998) 2661.
- (342) M. Van Puymbroeck, M.E.M. Kuilman, R.F.M. Maas, R.F. Witkamp, L. Leyssens, D. Vanderzande, J. Gelan, J. Raus, **Analyst**, 123 (1998) 2681.
- (343) M. Walshe, M. O'Keeffe, B. Le Bizec, **Analyst**, 123 (1998) 2687.
- (344) L. Dehennin, M. Ferry, P. Lafarge, G. Pérès, J.P. Lafarge, **Steroids**, 63 (1998) 80.
- (345) W.N. Sawaya, K.P. Lone, A. Husain, B. Dashti, S. Al-Zenki, **Food Chem.**, 63 (1998) 563.

-
- (346) T. Saeed, I. Naimi, N. Ahmad, W.N. Sawaya, **Food Control**, 10 (1999) 169.
- (347) L. Dehennin, Y. Bonnaire, PH. Plou, **J. Chromatogr. B**, 721 (1999) 301.
- (348) B. Le Bizec, F. Monteau, I. Gaudin, F. André, **J. Chromatogr. B**, 723 (1999) 157.
- (349) R. Aguilera, D.H. Catlin, M. Becchi, A. Phillips, C. Wang, R.S. Swerdloff, H.G. Pope, C.K. Hatton, **J. Chromatogr. B**, 727 (1999) 95.
- (350) J. Kokkonen, A. Leinonen, J. Tuominen, T. Seppälä, **J. Chromatogr. B**, 734 (1999) 179.
- (351) Y. Gaillard, F. Vayssette, A. Balland, G. Pépin, **J. Chromatogr. B**, 735 (1999) 189.
- (352) M.H. Choi, B.C. Chung, **Analyst**, 124 (1999) 1297.
- (353) M.H. Choi, K.R. Kim, B.C. Chung, **Steroids**, 65 (2000) 54.
- (354) P. Liere, Y. Akwa, S. Weill-Engerer, B. Eychenne, A. Pianos, P. Robel, J. Sövall, M. Schumacher, E.E. Baylieu, **J. Chromatogr. B**, 739 (2000) 301.
- (355) F. Callies, W. Arlt, L. Siekmann, D. Hübler, F. Bidlingmaier, B. Allolio, **Steroids**, 65 (2000) 98.
- (356) M.H. Choi, K.R. Kim, B.C. Chung, **Analyst**, 125 (2000) 711.
- (357) K. Carole, **J. Chromatogr. A**, 872 (2000) 309.
- (358) V. Ferchaud, F. Courcoux, B. Le Bizec, G. Monteau, F. André, **Analyst**, 125 (2000) 2255.
- (359) J. Segura, S. Pichini, S. H. Peng, X. De la Torre, **Fores. Sci. Intl.**, 107 (2000) 347.
- (360) Gaillard et al., **Fores. Sci. Intl.**, 107 (2000) 361.
- (361) V. Uralets, P. Gillette, **J. Anal. Toxic.**, 24 (2000) 188.
- (362) Y. Shinohara, K. Isurugi, T. Hashimoto, **J. Chromatogr. B**, 741 (2000) 271.
- (363) V. Ferchaud, B. Le Bizec, F. Monteau, F. André, **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 14 (2000), 652.
- (364) M.H. Choi, Y. S. Yoo, B.C. Chung, **J. Chromatogr. B**, 754 (2001) 309.
- (365) A. McKinney, D. Ridley, C. Suann, **J. Chromatogr. B**, 765 (2001) 71.
- (366) E. Haber, J. Muñoz-Guerra, C. Soriano, D. Carreras, C. Rodríguez, F. Rodríguez, **J. Chromatogr. B**, 775 (2001) 17.
- (367) J. Cooper, W. Currie, C. Elliott, **J. Chromatogr. B**, 757 (2001) 221.
- (368) J. Mathurin, V. Herrou, E. Bourgoigne, L. Pascaud, J. de Ceaurriz, **J. Chromatogr. B**, 759 (2001) 267.
- (369) A. Galán Martín, J. Maynar Mariño, M. García de Tiedra, J. Rivero Marabé, M. Caballero Loscos, M. Maynar Mariño, **J. Chromatogr. B**, 761 (2001) 229.
- (370) F. Buiarelli, G. Cartoni, L. Amándola, F. Botré, **Anal. Chim. Acta**, 447 (2001) 75.
- (371) X. De la Torre, J. González, S. Pichini, J. Pascual, J. Segura, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 24 (2001) 645.
- (372) K.J.S. De Cock, F.T. Delbeke, P. Van Eenoo, N. Desmet, K. Roels, P. De Backer, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 25 (2001) 843.
- (373) W.C. Hubbard, M.C. Liu, C. Bickel, D. Argenti, D. Heald, R.P. Schleimer, **Anal. Biochem.**, 290 (2001) 18.
- (374) S. Impens, K. De Wasch, M. Cornelis, H. F. De Brabander, **J. Chromatogr. A**, 970 (2002) 235.
- (375) G. Schmidt, H. Steinhart, **Food Chem.**, 76 (2002) 83.

-
- (376) C. Rodrigues Cardoso, M.A. Sipoli Marques, R. Carvalho Caminha, M.C. Maioli, F.R. Aquino Neto, **J. Chromatogr. B**, 775 (2002) 1.
- (377) J. Song, L. Wadhwa, B.A. Bejjani, W.E. O'Brien, **J. Chromatogr. B**, 791 (2003) 127.
- (378) C. Saudan, N. Baume, P. Mangin, M. Saugy, **J. Chromatogr. B**, 810 (2004) 157.
- (379) Y. Matsuzaki, S. Yoshida, A. Honda, T. Miyazaki, N. Tanaka, Y. Fujimoto, H. Miyazaki, **Steroids**, 69 (2004) 817.
- (380) J. Marcos, X. de la Torre, J.C. Gonzalez, J. Segura, J.A. Pascual, **Anal. Chim. Acta**, 522 (2004) 79.
- (381) M.R. Fuh, S.Y. Huang, T.Y. Lin, **Talanta**, 64 (2004) 408.
- (382) V. Marcos, E. Perogordo, P. Espinosa, M. Martin de Pozuelo, H. Hooghuis, **Anal. Chim. Acta**, 507 (2004) 219.
- (383) S. Diallo, L. Lecanu, J. Greeson, V. Papadopoulos, **Anal. Biochem.**, 324 (2004) 123.
- (384) M. Machnik, M. Duee, M. Parr, C. von Kuk, W. Schaenzer, **Chromatographia**, 1 (2004) 59.
- (385) W. Karpiesiuk, A.F. Lehner, C.G. Hughes, T. Tobin, **Chromatographia**, 60 (2004) 359.
- (386) L. Rambaud, E. Bichon, N. Cesbron, F. André, B. Le Bizec, **Anal. Chim. Acta**, 532 (2005) 165.
- (387) V. Pouzar, I. Cerny, M. Hill, Marie Bickova, R. Hampl, **Steroids**, 70 (2005) 739.
- (388) J. Seo, H.-Y. Kim, B.C. Chung, J. Hong, **J. Chromatogr. A**, 1067 (2005) 303.
- (389) L. Mateus-Avois, P. Mangin, M. Saugy, **J. Chromatogr. B**, 816 (2005) 193.
- (390) A.T. Cawley, R. Kazlauskas, G.J. Trout, A.V. George, **J. Chromatogr. B**, 825 (2005) 1.
- (391) K. Zhang, Y. Zuo, **Anal. Chim. Acta**, 554 (2005) 190.
- (392) C. Buisson, M. Hebestreit, A.P. Weigert, K. Heinrich, H. Fry, U. Flenker, S. Banneke, S. Prevost, F. André, W. Schaenzer, E. Houghton, B. Le Bizec, **J. Chromatogr. A**, 1093 (2005) 69.
- (393) A. Shareef, M. J. Angove, J. D. Wells, **J. Chromatogr. A**, 1108 (2006) 121.
- (394) L. Yang, T. Luan, C. Lan, **J. Chromatogr. A**, 1104 (2006) 23.
- (395) R. Montes de Oca Porto, A. Rodríguez Fernandez, D. Martinez Brito, T. Correa Vidal, A. Lopez Diaz, **J. Chromatogr. B**, 830 (2006) 178.
- (396) A. Leinonen, K. Vuorensola, L.M. Lepola, T. Kuuranne, T. Kotiaho, R.A. Ketola, R. Kostianen, **Anal. Chim. Acta**, 559 (2006) 166.
- (397) C.L. Xu, C.F. Peng, K. Hao, Z.Y. Jin, X.G. Chu, **Analytical Letters**, 39 (2006) 555.
- (398) B. Le Bizec, F. Courant, I. Gaudin, E. Bichon, B. Destrez, R. Schilt, R. Draisci, F. Monteau, F. André, **Steroids**, 71 (2006) 1078.
- (399) H. Noppe, K. Verheyden, W. Gillis, D. Courtheyn, P. Vanthemsche, H.F. De Brabander, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 22.
- (400) M.W.F. Nielen, J.J.P. Lasaroms, M.L. Essers, M.B. Sanders, H.H. Heskamp, T.F.H. Bovee, J.H. van Rhijn, M.J. Groot, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 30.
- (401) S. Impens, J. Van Loco, J.M. Degroodt, H. De Brabander, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 43.
- (402) R. Galarini, A. Piersanti, S. Falasca, S. Salamida, L. Fioroni, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 130.

-
- (403) P.R. Kootstra, P.W. Zoontjes, E.F. van Tricht, S.S. Sterk, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 82.
- (404) L. Rambaud, F. Monteau, Y. Deceuninck, E. Bichon, F. André, B. Le Bizec, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 93.
- (405) M. Roig, J. Segura, R. Ventura, **Anal. Chim. Acta**, 586 (2007) 184.
- (406) R. Muñoz-Valencia, S.G. Ceballos-Magaña, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, **Anal. Chim. Acta**, Submitido para publicación.
- (407) D.H. Catlin, R. Craig, C.K. Hatton, M.H. Sekera, J.L. Merdink, **Clin. Chem.**, 33 (1987) 319.
- (408) E.H. Jansen, L. Van Ginkel, R.H. Van den Berg, R. Stephany, **J. Chromatogr. B**, 580 (1992) 111.
- (409) L.A. Van Ginkel, E.H. Jansen, R. Stephany, P.W. Zoontges, P.L. Schwillens, H.J. Van Rossum, T. Visser, **J. Chromatogr. B**, 624 (1992) 389.
- (410) V.A.TH. Brinkman, **J. Chromatogr. A**, 665 (1994) 217.
- (411) R. K. Mueller, J. Grosse, R. Lang, D. Thieme, **J. Chromatogr. B**, 674 (1995) 1.
- (412) E. Venturelli, A. Cavalleri, G. Secreto, **J. Chromatogr. B**, 671 (1995) 363.
- (413) D.H. Catlin, C.K. Hatton, S.H. Starcevitz, **Clin. Chem.**, 43 (1997) 1280.
- (414) H.H. Maurer, **J. Chromatogr. B**, 713 (1998) 3.
- (415) J. Segura, R. Ventura, C. Jurado, **J. Chromatogr. B**, 713 (1998) 61.
- (416) B.G. Wolthers, G.P.B. Kraan, **J. Chromatogr. A**, 843 (1999) 247.
- (417) P. Marquet, G. Lachâtre, **J. Chromatogr. B**, 733 (1999) 93.
- (418) N.H. Snow, **J. Chromatogr. A**, 885 (2000) 445.
- (419) L. Rivier, **Foresnic Sci. Intl.**, 107 (2000) 309.
- (420) K. Shimada, K. Mitamura, T. Higashi, **J. Chromatogr. A**, 935 (2001) 141.
- (421) O. Nozaki, **J. Chromatogr. A**, 935 (2001) 267.
- (422) A. Marwah, P. Marwah, H. Lardy, **J. Chromatogr. A**, 935 (2001) 279.
- (423) G. Eiceman, J. Gardea-Torresdey, E. Overton, K. Carney, F. Dorman, **Anal. Chem.**, 74 (2002) 2771.
- (424) D. Courtheyn, B. Le Bizec, G. Brambilla, H.F. De Brabander, E. Cobbaert, M. Van de Wiele, J. Vercammen, K. De Wasch, **Anal. Chim. Acta**, 473 (2002) 71.
- (425) M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, **J. Chromatogr. A**, 974 (2002) 23.
- (426) G. Balizs, A. Hewitt, **Anal. Chim. Acta**, 492 (2003) 105.
- (427) M.J. Lopez de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, **J. Chromatogr. A**, 1000 (2003) 503.
- (428) S. Görög, **Anal. Sciences**, 20 (2004) 767.
- (429) B. Le Bizec, P. Marchand, D. Maume, F. Monteau, F. André, **Chromatographia**, 59 (2004) S3.
- (430) J.P. Antignac, F. Monteau, J. Negriolli, F. André, B. Le Bizec, **Chromatographia**, 59 (2004) S13.
- (431) A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, **J. Chromatogr. A**, 1067 (2005) 15.
- (432) A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, **Trens Anal. Chem.**, 24 (2005) 704.
- (433) M. Gratacós-Cubarsí, M. Castellari, A. Valero, J. García-Regueiro, **J. Chromatogr. B**, 834 (2006) 14.

-
- (434) R. Zeleny, F. Ulberth, P. Gowik, J. Polzer, L.A. van Ginkel, H. Emons, **Trens Anal. Chem.**, 25 (2006) 927.
- (435) M.E. Dikeman, **Meat Sci.**, 77 (2007) 121.

ANEXO I

3. VALIDACIÓN

La validación demostrará que el método analítico cumple los criterios relativos a las características de funcionamiento aplicables.

Controles con objetivos diferentes requieren distintas categorías de métodos. El cuadro siguiente determina qué características de funcionamiento han de comprobarse para cada tipo de método.

Cuadro 9

Clasificación de los métodos analíticos en función de las características de funcionamiento que deben determinarse

		Límite de detección CCβ	Límite de decisión CCα	Veracidad/ la recuperación	Precisión	Selectividad/ especificidad	Aplicabilidad/ robustez/ estabilidad
Métodos cualitativos	S	+	–	–	–	+	+
	C	+	+	–	–	+	+
Métodos cuantitativos	S	+	–	–	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = métodos de criba; C = métodos de confirmación; + = determinación obligatoria.

3.1. PROCEDIMIENTOS DE VALIDACIÓN

En este capítulo se ofrecen ejemplos o referencias de procedimientos de validación de los métodos analíticos. Pueden utilizarse otros enfoques para demostrar que el método analítico cumple los criterios de funcionamiento, a condición de que alcancen la misma cantidad y calidad de información.

La validación también puede realizarse a través de un estudio interlaboratorios, como se establecen en el Codex Alimentarius, las normas ISO o la IUPAC (12), o de acuerdo con métodos alternativos como estudios en un solo laboratorio, o la validación interna (13) (14). Esta parte se centra en los estudios en un solo laboratorio (o validación interna) a través de un enfoque modular. Este enfoque consiste en:

- 1) un conjunto de características comunes de funcionamiento, independiente del modelo de validación empleado, y
- 2) procedimientos más específicos que dependen del modelo, tal como se presenta en el cuadro 10 a continuación.

Cuadro 10

Parámetros de funcionamiento independientes y dependientes del modelo

Validación		
Parámetros de funcionamiento independientes del modelo	Parámetros de funcionamiento dependientes del modelo	
Características comunes de funcionamiento (3.1.1)	Enfoque convencional de la validación (3.1.2)	Enfoque de la validación interna (3.1.3)
Especificidad	La recuperación	La recuperación
Veracidad	Repetibilidad	Repetibilidad
Robustez: cambios menores	Reproducibilidad intralaboratorio	Reproducibilidad intralaboratorio
Estabilidad	Reproducibilidad	Reproducibilidad
	El límite de decisión (CCα)	El límite de decisión (CCα)
	Capacidad de detección (CCβ)	Capacidad de detección (CCβ)
	Curvas de calibración	Curvas de calibración
	Robustez: cambios importantes	Robustez

3.1.1. Características de funcionamiento independientes del modelo

Al margen del enfoque de validación que se adopte, deben determinarse las siguientes características de funcionamiento. Para minimizar la carga de trabajo, puede emplearse un planteamiento cuidadosamente diseñado y estadísticamente sólido para combinar experimentos realizados con el fin de determinar diferentes parámetros.

3.1.1.1. Especificidad

En los métodos analíticos es importante el poder de distinción entre el analito y sustancias afines (isómeros, metabolitos, productos de degradación, sustancias endógenas, constituyentes de la matriz, etc.). Son necesarios dos enfoques para comprobar si existen interferencias.

Por ello, se elegirán sustancias que potencialmente interfieran y se analizarán muestras en blanco pertinentes para detectar posibles interferencias y valorar sus efectos:

- seleccione una gama de compuestos químicamente relacionados (metabolitos, derivados, etc.) u otras sustancias que puedan encontrarse en las muestras con el compuesto de interés,
- analice un número apropiado de muestras en blanco representativas ($n \geq 20$) y verifique posibles interferencias (señales, picos, indicios de iones) en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito,
- asimismo, se enriquecerán muestras en blanco representativas hasta una concentración adecuada con sustancias que pueden interferir con la identificación o la cuantificación del analito,
- después del análisis estudie si:
 - dicha presencia puede conducir a una falsa identificación,
 - la identificación del analito se ve dificultada por la presencia de una o más interferencias, o
 - la cuantificación sufre una influencia apreciable.

3.1.1.2. Veracidad

En este apartado se describe la determinación de la veracidad (un componente de la exactitud). La veracidad sólo puede establecerse mediante material de referencia certificado (CRM). Se utilizará CRM siempre que se pueda. El procedimiento se describe detalladamente en la norma ISO 5725-4 (5). Presentamos un ejemplo a continuación:

- analice 6 muestras idénticas del CRM siguiendo las instrucciones de ensayo del método,
- determine la concentración del analito en cada una de dichas muestras,
- calcule la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) para estas concentraciones,
- calcule la veracidad dividiendo la concentración media detectada por el valor certificado (medido como concentración) y multiplíquelo por 100, para expresar el resultado en porcentaje:

Veracidad (%) = concentración media detectada (tras introducción del factor corrector de recuperación) \times 100/valor certificado.

Si no se dispone de CRM, en lugar de la veracidad puede determinarse la recuperación, tal como se describe en el punto 4.1.2.1.

3.1.1.3. Aplicabilidad/robustez (cambios menores)

En estos estudios se utiliza la introducción deliberada por el laboratorio de variaciones menores razonables y la observación de sus consecuencias.

Deben realizarse estudios previos a la investigación seleccionando factores del pretratamiento, limpieza y análisis de la muestra que pueden influir en los resultados de la medición. Entre estos factores se cuentan el operador, la procedencia y la edad de los reactivos, disolventes, patrones y extractos de la muestra, la velocidad de calentamiento, la temperatura, el pH y muchos otros factores que pueden darse en el laboratorio. Conviene modificar dichos factores en un orden de magnitud acorde con las desviaciones habituales entre laboratorios.

- identifique posibles factores que pudieran influir en los resultados,
- varíe ligeramente cada factor,

- realice una prueba de robustez según el método de Youden (15)(16) (a este nivel pueden emplearse otros métodos homologados, pero el método de Youden reduce al mínimo el tiempo y el esfuerzo requeridos). El método de Youden es un diseño factorial fraccional. No permite detectar interacciones entre los diversos factores,
- si se observa que un factor influye significativamente en los resultados de la medición, proceda a otros experimentos para determinar los límites de aceptabilidad de dicho factor,
- los factores que influyen significativamente en los resultados deben quedar claramente identificados en el protocolo del método.

La idea de base no es estudiar una alteración a la vez, sino introducir diversas variaciones simultáneamente. Por ejemplo, imaginemos que A, B, C, D, E, F, G son los valores nominales de siete factores distintos que podrían influir en los resultados si sus valores nominales se cambian ligeramente. Demos a sus valores alternativos las minúsculas correspondientes a, b, c, d, e, f, g. Esto nos da 2⁷ o 128 combinaciones diferentes.

Puede tomarse un subconjunto de ocho de dichas combinaciones, con una mezcla equilibrada de mayúsculas y de minúsculas (cuadro 11). Debe procederse a ocho determinaciones, utilizando una combinación de los factores elegidos (A-G). En el cuadro 11 se presentan los resultados de las determinaciones (S-Z).

Cuadro 11

Configuración del experimento para estudios de robustez (cambios menores)

Valor del factor F	Combinación de determinaciones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado observado R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Para los cálculos, véanse los ejemplos de ensayos de robustez en el punto 3.3.

3.1.1.4. Estabilidad

Se ha observado que la insuficiente estabilidad del analito o de los constituyentes de la matriz en la muestra durante el almacenamiento o el análisis puede dar origen a desviaciones significativas del resultado del análisis. Además, debe comprobarse la estabilidad del patrón de calibración en la solución. Normalmente, la estabilidad del analito está debidamente caracterizada para diversas condiciones de almacenamiento. El control de las condiciones de almacenamiento debe formar parte del sistema habitual de acreditación del laboratorio. Si no se conoce este particular, a continuación se ofrecen ejemplos de cómo determinar la estabilidad.

Estabilidad del analito en la solución

- Prepare nuevas soluciones madre del analito y dilúyalas, siguiendo las instrucciones de ensayo, para obtener el número suficiente de alícuotas (por ejemplo, 40) de cada concentración seleccionada (en torno al límite de funcionamiento mínimo exigido en el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, o en torno al límite permitido para las demás sustancias). Prepare soluciones de los analitos empleados en el enriquecimiento y en la solución del análisis final, y de cualquier otra solución de interés (por ejemplo, patrones derivados).
- Mida el contenido de analito en la solución recién preparada, siguiendo las instrucciones de ensayo.
- Vierta los volúmenes adecuados en recipientes apropiados, etiquételos y almacénelos de acuerdo con el procedimiento descrito en el cuadro 12.

Cuadro 12

Procedimiento para la determinación de la estabilidad del analito en la solución

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
A oscuras	10 alícuotas	10 alícuotas	10 alícuotas
A la luz			10 alícuotas

- El tiempo de almacenamiento puede ser de 1, 2, 3 y 4 semanas o más si es necesario, es decir, hasta que se observen los primeros fenómenos de degradación durante la identificación o la cuantificación. Debe registrarse el tiempo máximo y las condiciones óptimas de almacenamiento.
- Debe calcularse la concentración del analito (o los analitos) en cada alícuota tomando como valor 100 % la solución del analito recién preparado en el momento del análisis.
Resto del analito (%) = $C_i \times 100 / C_{\text{fresco}}$
 C_i = concentración en el momento i
 C_{fresco} = concentración de la solución recién preparada.

Estabilidad del analito (o los analitos) en la matriz

- Utilice muestras reales siempre que sea posible. Cuando no disponga de ellas, utilice matriz enriquecida con el analito.
- Si dispone de ellas, determine la concentración en el material mientras está aún fresco. Tome otras alícuotas del material después de 1, 2, 4 y 20 semanas, y determine las concentraciones. El tejido debe almacenarse como mínimo a - 20 °C, o menos si es necesario.
- Si no dispone de material real, tome material en blanco y homogenícelo. Divida el material en 5 alícuotas. Enriquezca cada alícuota con el analito, preparado de preferencia en una pequeña cantidad de solución acuosa. Analice una alícuota inmediatamente. Almacene las alícuotas restantes como mínimo a - 20 °C, o menos si es necesario, y analícelas tras 1, 2, 4 y 20 semanas.

3.1.1.5. Curvas de calibración

Cuando se utilizan curvas de calibración para la cuantificación es preciso:

- emplear al menos cinco niveles (incluyendo el cero) en la construcción de la curva,
- describir el intervalo de trabajo de la curva,
- describir la fórmula matemática de la curva y la bondad del ajuste de los datos a la curva,
- describir los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva.

Si es necesaria una calibración en serie de una solución patrón, se indicarán ámbitos aceptables para los parámetros de la curva de calibración, que pueden variar de una serie a otra.

3.1.2. Procedimientos convencionales de validación

El cálculo de los parámetros por métodos convencionales exige la realización de diversos experimentos aislados. Debe determinarse cada característica de funcionamiento para cada cambio importante (véase el apartado sobre aplicabilidad/robustez). Con los métodos multianalitos pueden analizarse varios analitos simultáneamente, siempre que previamente se hayan descartado posibles interferencias de importancia. De modo similar pueden determinarse varias características de funcionamiento. Así pues, para minimizar la carga de trabajo es conveniente combinar los experimentos cuando sea posible (por ejemplo, la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio con la especificidad, el análisis de muestras en blanco para determinar el límite decisión y las pruebas de especificidad).

3.1.2.1. La recuperación

cuando no se dispone de CRM, debe determinarse la recuperación mediante experimentos con matriz en blanco enriquecida, por ejemplo mediante el procedimiento siguiente:

- seleccione 18 alícuotas de un material en blanco y enriquezca cada 6 de ellas con 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite permitido,
- analice las muestras y calcule la concentración en cada muestra,

- mediante la siguiente ecuación, calcule la recuperación para cada muestra,
- calcule la recuperación media y el CV de los 6 resultados a cada nivel,
- % de recuperación = $100 \times \text{contenido medido/nivel de enriquecimiento}$.

El método convencional de determinación de la recuperación es una variante del método de adición de patrón descrito en el punto 3.5, si:

- la muestra se considera en blanco, en vez de una muestra para analizar,
- se considera que el componente final ⁽¹⁾ y la recuperación ⁽²⁾ son similares para ambas porciones de ensayo,
- las muestras de ensayo tienen la misma masa, y los extractos de las fracciones de ensayo el mismo volumen,
- la cantidad de patrón de calibración añadida a la segunda porción de ensayo (enriquecida) se expresa x_{ADD} .
($x_{\text{ADD}} = \rho_A \cdot V_A$),
- x_1 es el valor medido del blanco y x_2 el valor medido de la segunda porción de ensayo (enriquecida);
- entonces, el % de recuperación = $100 (x_2 - x_1)/x_{\text{ADD}}$.

Si cualquiera de las condiciones mencionadas no se cumple (o se supone que no se cumple), se llevará a cabo el procedimiento completo de determinación de la recuperación por el método de la adición de patrón que se describe en el punto 3.5.

3.1.2.2. Repetibilidad

- Prepare un conjunto de muestras de matrices idénticas, enriquecidas con el analito para dar concentraciones equivalentes a 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite permitido.
- En cada nivel debe procederse al análisis con un mínimo de 6 muestras idénticas.
- Analice las muestras.
- Calcule la concentración detectada en cada muestra.
- Determine la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de las muestras enriquecidas.
- Repita estos pasos al menos otras dos veces.
- Calcule las concentraciones medias generales y los CV de las muestras enriquecidas.

3.1.2.3. Reproducibilidad intralaboratorio

- Prepare un conjunto de muestras de materiales de ensayo especificados (de matrices idénticas o diferentes), enriquecidas con el analito para dar concentraciones equivalentes a 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite permitido.
- En cada nivel debe procederse al análisis con un mínimo de 6 muestras idénticas.
- Repita estos pasos al menos otras dos veces con operadores diferentes y distintas condiciones ambientales (por ejemplo, diferentes lotes de reactivos, disolventes, temperaturas ambientales, instrumentos, etc.).
- Analice las muestras.
- Calcule la concentración detectada en cada muestra.
- Determine la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de las muestras enriquecidas.

3.1.2.4. Reproducibilidad

De acuerdo con la norma ISO 5725-2 (5), para verificar la reproducibilidad los laboratorios deben participar en estudios colaborativos.

3.1.2.5. Límite de decisión (CC_α)

El límite de decisión debe establecerse según los requisitos de identificación, o de identificación más cuantificación, definidos en la parte 2, «Criterios de funcionamiento y otros requisitos y procedimientos de los métodos analíticos».

⁽¹⁾ Componente final: fracción de la masa del analito contenida en la muestra y presente en el extracto final.

⁽²⁾ Recuperación (aquí): fracción de la masa del analito añadida a la muestra que está presente en el extracto final. En el resto del documento se supone que el componente final y la recuperación son iguales, por lo que sólo se utilizará el término «recuperación».

En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CC α :

- bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor crítico de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco, enriquecido hasta el límite de funcionamiento mínimo exigido, y por encima del mismo, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal frente a la concentración añadida. El límite de decisión es igual a la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de la ordenada en origen. Esto sólo se aplica a análisis cuantitativos ($\alpha = 1\%$),
- bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, para poder calcular la relación señal-ruido en la banda en la que se espera encontrar el analito. Puede usarse como límite de decisión un valor triple al de la relación señal-ruido. Esto es aplicable a análisis cuantitativos y cualitativos.

En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CC α :

- bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor crítico de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco, enriquecido en torno al límite permitido en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal frente a la concentración añadida. El límite de decisión ($\alpha = 5\%$) equivale a la concentración correspondiente al límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio,
- bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito hasta el límite permitido. El límite de decisión ($\alpha = 5\%$) es igual a la concentración en el límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar correspondiente.

Véase también el artículo 5 y el punto 3.2.

3.1.2.6. La capacidad de detección (CC β)

La capacidad de detección debe establecerse según los requisitos definidos de cribado, de identificación o de identificación más cuantificación (véase la parte 2).

En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CC β :

- bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor mínimo detectable de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco representativo, enriquecido hasta el límite de funcionamiento mínimo exigido, y por debajo del mismo, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal frente a la concentración añadida. La capacidad de detección ($\beta = 5\%$) es igual a la concentración correspondiente al límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medio medido en el límite de decisión,
- bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito en cantidades hasta el límite de decisión. Analice las muestras e identifique los analitos. La capacidad de detección ($\beta = 5\%$) es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido,
- si no se dispone de resultados cuantitativos, la capacidad de detección puede determinarse investigando el material blanco enriquecido hasta el límite de decisión y por encima del mismo. En este caso, la capacidad de detección del método es igual al nivel de concentración, en el que sólo queda $\leq 5\%$ de resultados de falso conforme. Por ello, debe procederse a un mínimo de 20 análisis para al menos un nivel de concentración a fin de garantizar la fiabilidad de esta determinación.

En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CC β :

- bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor mínimo detectable de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco representativo, enriquecido en torno al límite permitido en incrementos equidistantes. Analice las muestras e identifique los analitos. Calcule la desviación estándar del contenido medio en el límite de decisión. La capacidad de detección ($\beta = 5\%$) es igual a la concentración correspondiente al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio.
- bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito hasta el límite de decisión. La capacidad de detección ($\beta = 5\%$) es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar correspondiente.

Véase también el punto 3.2.

3.1.2.7. Robustez (cambios importantes)

El método de análisis debe probarse en diversas condiciones experimentales, por ejemplo ante diferentes especies, matrices o condiciones de muestreo. Los cambios introducidos deben ser importantes. La importancia de esos cambios puede evaluarse utilizando, por ejemplo, el enfoque Youden (15) (16). Para todo cambio importante debe determinarse cada característica de funcionamiento que haya tenido un efecto significativo en el funcionamiento del análisis.

3.1.3. Validación mediante métodos alternativos

Si se aplican procedimientos alternativos de validación, se indicará en el protocolo de validación el modelo y la estrategia, con sus respectivos requisitos previos, hipótesis y fórmulas, o, cuando menos, sus referencias. Se presenta a continuación un ejemplo de planteamiento alternativo. Si se aplica, por ejemplo, el modelo de validación interna, las características de funcionamiento se determinan de una manera que permita una validación para los cambios importantes en el mismo procedimiento de validación. Ello exige definir un plan experimental de validación

3.1.3.1. Plan experimental

Debe elaborarse un plan experimental, en función del número de especies y de factores diferentes que se pretenda estudiar. Por ello, en el primer paso de todo el proceso de validación se estudiarán las poblaciones de muestras que se analizarán en el futuro en el laboratorio para seleccionar las especies más importantes y aquellos factores que pueden influir en los resultados de las mediciones. Posteriormente, se elegirá el intervalo de concentración adaptado a la finalidad de acuerdo con el nivel de interés.

Ejemplo:

- Pueden estudiarse simultáneamente varios analitos mediante el método de análisis que se está validando.
- Se han identificado dos variantes del factor dominante (A y B). Los factores dominantes forman la base sobre la cual se combinan los niveles del factor. Entre estos factores dominantes pueden figurar la especie o la matriz. En el presente ejemplo, el factor dominante se varió en dos niveles, es decir, se consideraron dos especies distintas (A y B). De manera general, se pueden variar los factores dominantes en más de dos niveles, lo cual sólo aumenta el número de análisis que deben realizarse.
- Los factores seleccionados se variarán en dos niveles (que se indican como + o -).

Cuadro 13

Factores considerados importantes en el procedimiento de validación

Sexo del animal	(factor 1)
Raza	(factor 2)
Condiciones de transporte	(factor 3)
Condiciones de almacenamiento	(factor 4)
Frescura de la muestra	(factor 5)
Condiciones de engorde	(factor 6)
Distintos operadores con diferentes grados de experiencia	(factor 7)

Cuadro 14

Posible plan experimental para el ejemplo propuesto

Especie	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Muestra nº
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Especie	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Muestra nº
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Como cada muestra (cada combinación de nivel de factores) tiene que enriquecerse con 4 concentraciones distintas en torno al nivel de interés, y como debe analizarse una muestra en blanco por nivel, se realizarán $5 \times 16 = 80$ análisis para todo el experimento de validación.

De los resultados de estos 80 resultados medidos es posible calcular (13) (14):

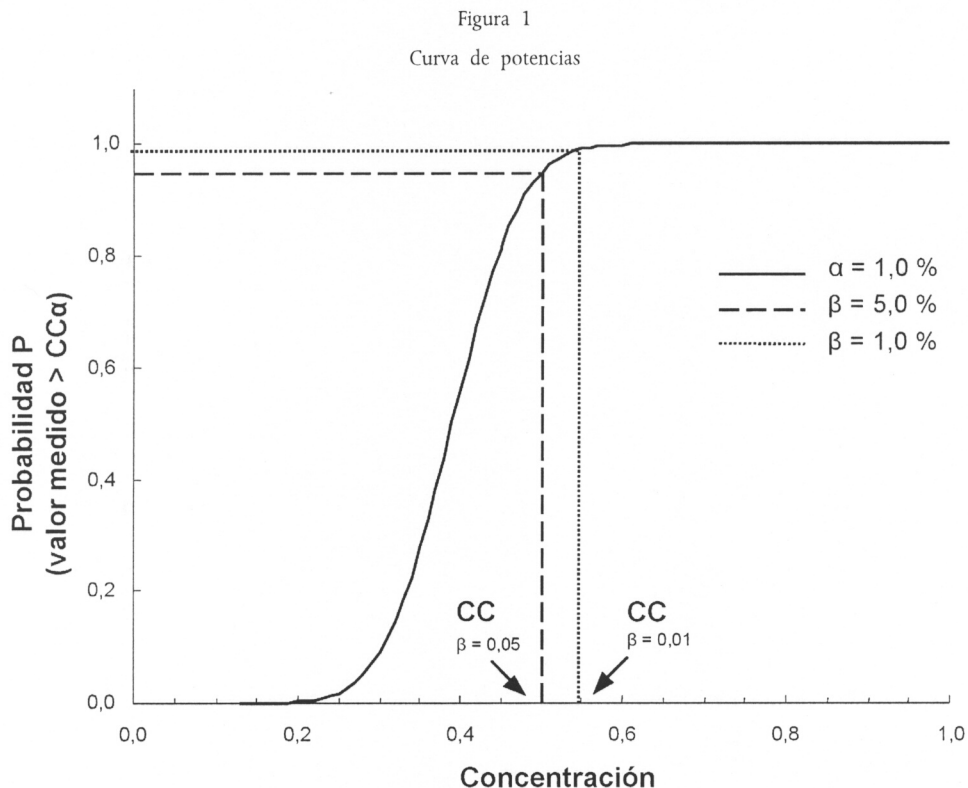
Recuperación

- la repetibilidad por nivel de concentración (s_w),
- la reproducibilidad intralaboratorio por nivel de concentración (s_{ik}),
- el límite de decisión ($CC\alpha$),
- la capacidad de detección ($CC\beta$),
- la curva de potencias (índice de error β frente a concentración; véase el punto 3.1.3.2),
- la robustez frente a los cambios importantes; la robustez frente a los cambios menores puede determinarse de acuerdo con lo expuesto en el punto 3.1.1.3,
- 16 curvas de calibración dependientes de la muestra,
- 1 curva de calibración global,
- el intervalo de predicción de la curva de calibración global,
- las desviaciones inducidas por la matriz (S_{mat}),
- las desviaciones inducidas por el proceso de análisis (S_{run}),
- el efecto de cada factor en los resultados de la medición.

Estas características de funcionamiento permiten la evaluación global del funcionamiento del método, pues no sólo se estudia la influencia de cada factor, sino también las combinaciones pertinentes de estos factores. Con ayuda de esta configuración experimental puede decidirse si se excluye de la curva de calibración global alguno de los factores, por apartarse significativamente de las desviaciones estándar de los demás factores.

3.1.3.2. Curva de potencias

La curva de potencias da información sobre la capacidad de detección del método en el intervalo de concentración elegido. Hace referencia al error β en la aplicación del método estudiado. La curva de potencias permite calcular la capacidad de detección de cada categoría de métodos (cribado, confirmación) o tipo (cualitativo o cuantitativo) para un error β determinado (por ejemplo, 5 %).



En la figura 1 se presenta un ejemplo del establecimiento gráfico de la capacidad de detección ($CC\beta$) de un método analítico. Este método concreto presenta un riesgo remanente del 5 % de llegar a una decisión de falso conforme en una concentración de 0,50 $\mu\text{g/kg}$. En una concentración de 0,55 $\mu\text{g/kg}$ el riesgo de llegar a una decisión de falso conforme disminuye hasta el 1 %.

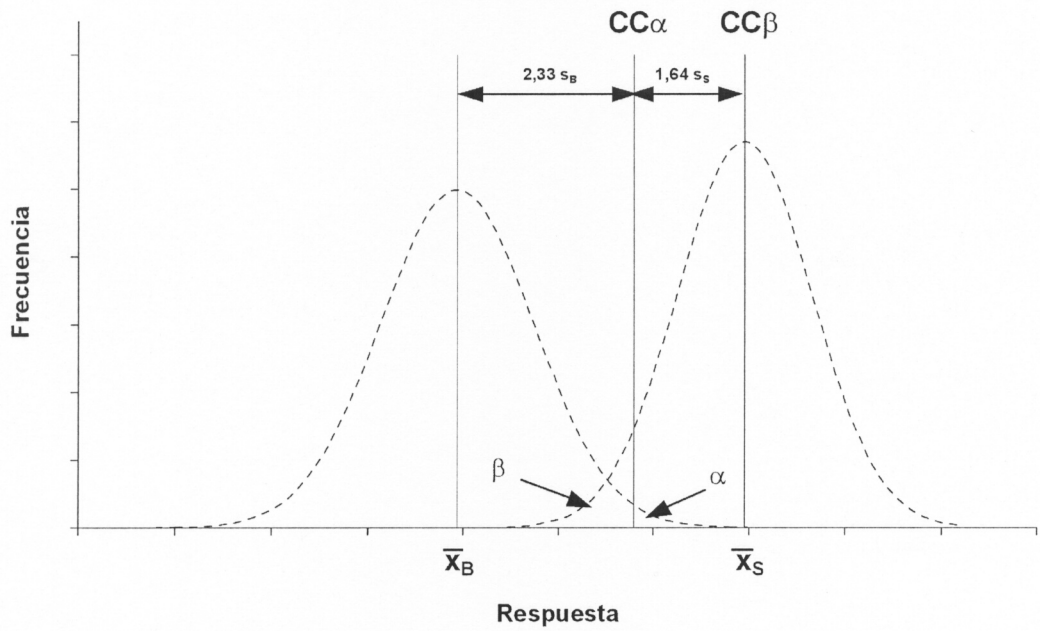
3.1.3.3. Reproducibilidad

La determinación de la reproducibilidad de un método mediante el concepto de estudio intralaboratorio (validación interna) exige la participación repetida en estudios de aptitud, de conformidad con las guías ISO 43-1 (3) y 43-2 (4). Los laboratorios pueden elegir sus propios métodos, siempre que se utilicen en condiciones de rutina. La desviación estándar del laboratorio puede utilizarse para evaluar la reproducibilidad del método.

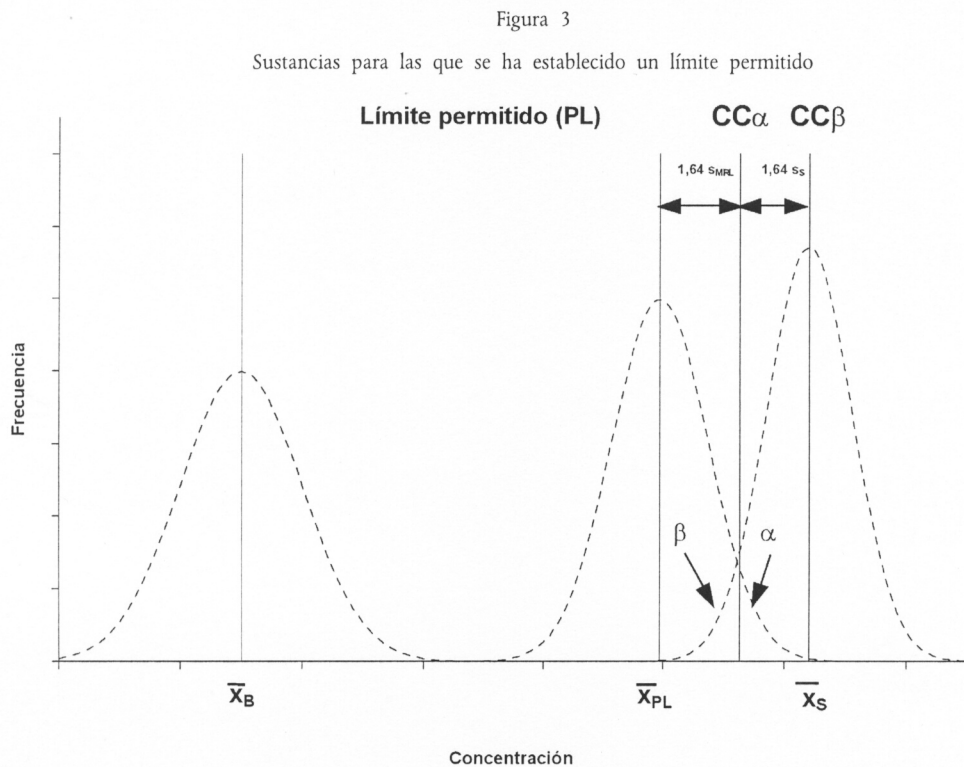
3.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DIVERSOS LÍMITES ANALÍTICOS

Figura 2

Sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido



- \bar{X}_S Valor medio de la respuesta de la muestra contaminada
- s_B Desviación estándar de la muestra en blanco (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
- s_S Desviación estándar de la muestra contaminada (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
- α Tasa de resultados falsos no conforme
- β Tasa de resultados falsos conforme
- CC_α Respuesta con un error α dado y un 50 % de error β
- CC_β Respuesta con un error α muy pequeño y un error β dado



- \bar{x}_B
- «Concentración» media de la muestra en blanco
- \bar{x}_{PL}
- Concentración media de la muestra que contiene el analito en el límite permitido
- \bar{x}_S
- Concentración media de la muestra contaminada
- s_{PL}
- Desviación estándar de la muestra que contiene el analito en el límite permitido (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
- s_S
- Desviación estándar de la muestra contaminada (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
- α
- Tasa de resultados falsos no conforme
- β
- Tasa de resultados falsos conforme
- CC α
- Respuesta con un error α dado y un 50 % de error β
- CC β
- Respuesta con un error α muy pequeño y un error β dado

3.3. EJEMPLO DE CÁLCULO PARA ESTUDIAR LA ROBUSTEZ DEL MÉTODO ANTE CAMBIOS MENORES, SEGÚN EL MÉTODO DE YOUTDEN (16)

Comparación de medias (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Compare las medias de las mayúsculas (A_A a A_G) con las medias de las minúsculas correspondientes (A_a a A_g). Si uno de los factores tiene un efecto, la diferencia será significativamente mayor que las diferencias de los otros factores.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	Un método robusto no debe verse afectado por los cambios que, con casi toda certeza, habrá entre laboratorios.
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	Si no existe una diferencia destacada, la medición más realista del error aleatorio la dan las siete diferencias.
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Diferencias (D)	Cuadrado de las diferencias (D_i^2)
$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$	$D_a^2 = \text{valor a}$
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$	$D_b^2 = \text{valor b}$
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$	$D_c^2 = \text{valor c}$
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$	$D_d^2 = \text{valor d}$
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$	$D_e^2 = \text{valor e}$
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$	$D_f^2 = \text{valor f}$
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$	$D_g^2 = \text{valor g}$

Desviación estándar de las diferencias D_i (S_{D_i}):

$$S_{D_i} = \sqrt{2 \cdot \Sigma(D_i^2/7)}$$

Si el valor S_{D_i} obtenido es significativamente mayor que la desviación estándar del método hallada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio expuestas (véase más arriba), puede deducirse que el conjunto de los factores influye en el resultado, aunque cada factor aislado no presente una influencia significativa, y que el método no es lo suficientemente robusto frente a las modificaciones escogidas.

3.4. EJEMPLOS DE CÁLCULO PARA EL PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN INTERNA

Ejemplos y cálculos para el protocolo de validación interna descrito en el apartado «validación de acuerdo con modelos alternativos» (3.1.3) (13) (14).

3.5. EJEMPLOS DEL MÉTODO DE ADICIÓN DE PATRÓN

Una muestra de ensayo con un contenido de analito T se divide en dos porciones de ensayo 1 y 2 de masas respectivas m_1 y m_2 . La porción de ensayo 2 se enriquece con un volumen V_A de una solución de concentración ρ_A del analito. Tras las fases de extracción y de purificación del método se obtienen dos extractos de las fracciones de ensayo, de volúmenes respectivos V_1 y V_2 . Se considera que la recuperación del analito es rc. Ambos extractos se analizan con un método de medición de sensibilidad b y dan una respuesta analítica de x_1 y x_2 , respectivamente.

Suponiendo que rc y b sean iguales para el analito en la muestra natural y en la enriquecida, el contenido T puede calcularse de la manera siguiente:

$$T = x_1 \cdot V_1 \cdot \rho_A \cdot V_A / (x_2 \cdot V_2 \cdot m_1 - x_1 \cdot V_1 \cdot m_2)$$

Este método permite determinar la recuperación rc. A continuación, además del análisis que acabamos de describir, se enriquece parte del extracto de la porción de ensayo 1 (de volumen V_3) con una cantidad conocida $\rho_B \cdot V_B$ del analito y se analiza. La respuesta analítica es x_3 y la recuperación es:

$$rc = x_2 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot \rho_B \cdot V_B / [x_3 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot (T \cdot m_2 + \rho_A \cdot V_A) - x_2 \cdot V_2 \cdot T \cdot m_1 \cdot (V_3 - V_B)]$$

Puede calcularse también la sensibilidad b:

$$b = x_1 \cdot V_1 / rc \cdot T \cdot m_1$$

Se han descrito todas las condiciones de aplicación y los detalles (18).

4. ABREVIATURAS EMPLEADAS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AES	Espectrometría de emisión atómica
AOAC-I	Asociación de químicos analíticos oficiales (AOAC International)
B	Fracción ligada (inmunoanálisis)
CI	Ionización química
CRM	Material de referencia certificado
CV	Coeficiente de variación
2 D	Bidimensional
DAD	Detección por red de diodos
DPASV	Voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución anódica
ECD	Detección de la captación electrónica
EI	Ionización por impacto electrónico
CG	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alto rendimiento
HRMS	(Espectrometría de masas) de alta resolución
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IR	Infrarrojo
ISO	Organización Internacional de Normalización
CL	Cromatografía líquida
LR(MS)	(Espectrometría de masas) de baja resolución
MRPL	Límite de funcionamiento mínimo exigido
MS	Espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
RF	Migración relativa al frente de disolvente (TLC)
RSDL	Desviaciones estándar relativas del laboratorio
SIM	Control de iones específicos
TLC	cromatografía en capa fina
UV	Luz ultravioleta
VIS	Luz visible.

5. REFERENCIAS

- (1) ISO 17025: 1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories.
- (2) ISO 3534-1: 1993 Statistical Methods for quality control — Vol. 1 vocabulary and symbols.
- (3) ISO Guide 43-1:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.
- (4) ISO Guide 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.
- (5) ISO 5725:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions; ISO 5725-2 Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method.

- (6) ISO 78-2:1999 Chemistry — Layouts for standards — Part 2: Methods of chemical analysis.
 - (7) W. G de Ruig and J. M Weseman «A new approach to confirmation by infrared spectrometry» J. Chemometrics 4 (1990) 61-77.
 - (8) Véase, por ejemplo, May, T. W., Brumbaugh, W. G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Analytical Chemistry 54(7): 1032-1037 (90353).
 - (9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, pp. xxvi + 675.
 - (10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992.
 - (11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, pp. 329.
 - (12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Applied Chem, 67, 331.
 - (13) Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120, 173.
 - (14) Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. J. Chromatogr., 716, 221.
 - (15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.
 - (16) W.J. Youden; Steiner, E.H.; «Statistical Manual of the AOAC—Association of Official Analytical Chemists», AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 ff.
 - (17) ISO 11843: 1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case.
 - (18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: «Yield or recovery: a world of difference». Proceedings 8th Euro Food Chem, Vienna, Austria September 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, pp. 2-9.
 - (19) Directive 71/354/EEC of 18 October 1971 on the approximation of the laws of the Member States relating to units of measurement Official Journal L 243, 29/10/1971, p. 29.
 - (20) ISO 31-0: 1992 Quantities and units — Part 0: General principles.
-